

Aus dem Anatomischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Über den Einfluß von bilateraler elektrischer Stimulation
des Ganglion cervicale superius
auf "synaptic ribbons", Serotonin-N-Acetyltransferase
und Hydroxyindol-O-Methyltransferase
der Zirbeldrüse männlicher Ratten

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Hans Werner Concemius
aus Neunkirchen/Saar

Mainz 1987



Aus dem Anatomischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Über den Einfluß von bilateraler elektrischer Stimulation
des Ganglion cervicale superius
auf "synaptic ribbons", Serotonin-N-Acetyltransferase
und Hydroxyindol-O-Methyltransferase
der Zirbeldrüse männlicher Ratten

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Hans Werner Concemius
aus Neunkirchen/Saar

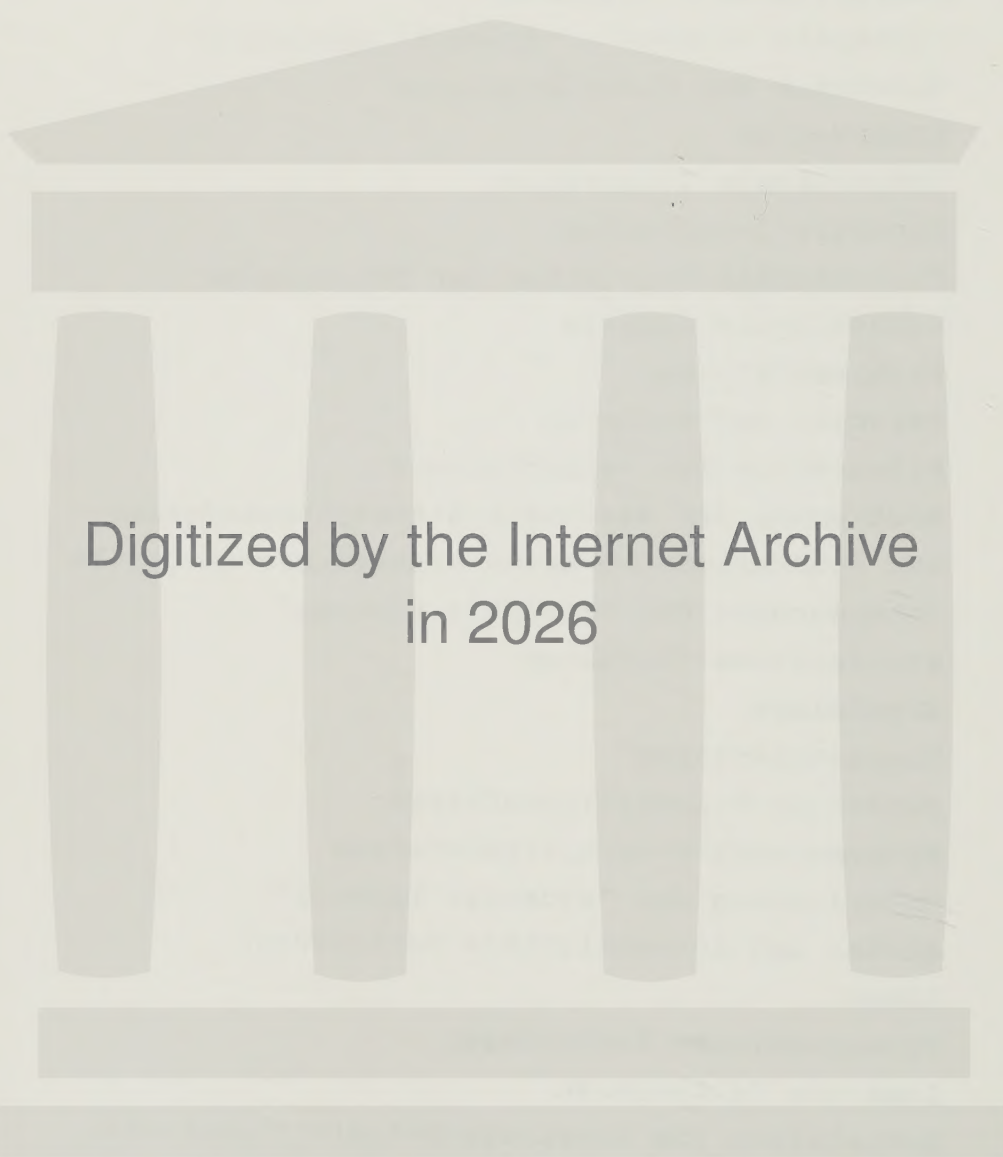
Mainz 1987

Dekan:	Professor Dr. M. Thelen
1.Gutachter	Professor Dr. L. Vollrath
2.Gutachter	Professor Dr. E. Weihe

Tag der Promotion: 16. DEZ. 1987

Meinen Eltern gewidmet

<u>Inhalt</u>	Seite
1. Einleitung	6
1.1. Morphologische Grundlagen	7
1.1.1. "Synaptic ribbons", "synaptic spherules"	8
1.2. Biochemie des Pinealkomplexes	10
1.3. Innervation	13
1.3.1. Sympathische Innervation	13
1.3.2. Zentrale Innervation	14
1.3.3. Photoneurale Regulation der Zirbeldrüse	14
1.4. Funktionelle Aspekte	16
1.5. Problemstellung	18
2. Material und Methodik	20
2.1. Präparation der Versuchstiere	20
2.2. Bestimmung der Serotonin-N-Acetyltransferase- und Hydroxyindol-O-Methyltransferase-Aktivität	21
2.3. Untersuchung der "synaptic ribbons"	21
2.4. Statistische Verfahren	22
3. Ergebnisse	24
3.1. Enzymaktivitäten	24
3.1.1. Serotonin-N-Acetyltransferase	24
3.1.2. Hydroxyindol-O-Methyltransferase	25
3.2. Untersuchung der "synaptic ribbons"	25
3.2.1. Anzahl und intrazelluläre Verteilung	25
3.2.2. Länge	29
3.2.3. Topographische Beziehungen	30
3.2.4. Lage zur Zellmembran	32
3.3. Korrelation von Serotonin-N-Acetyltransferase und Hydroxyindol-O-Methyltransferase-Aktivität und Anzahl der "synaptic ribbons"	36



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554422_0032

4.	Diskussion	37
4.1.	Enzymaktivitäten	37
4.1.1.	Serotonin-N-Acetyltransferase	37
4.1.2.	Hydroxyindol-O-Methyltransferase	39
4.2.	"Synaptic ribbons", "synaptic spherules"	40
4.2.1.	Morphologie	41
4.2.2.	Intrazelluläre Verteilung	42
4.2.3.	Topographische Beziehungen	43
4.2.4.	Reaktionen unter physiologischen und experimentellen Bedingungen	44
4.2.5.	Einfluß von Denervation und Stimulation am Ganglion cervicale superius	45
4.2.6.	Korrelation von "synaptic ribbons" und Melatoninbildung	47
5.	Zusammenfassung	48
6.	Literatur	49

1. Einleitung

Die Existenz der Zirbeldrüse, auch Pinealorgan, Corpus pineale oder Epiphysis cerebri genannt, ist schon seit über zweitausend Jahren bekannt.

Zuerst beschrieben wurde das Pinealorgan von dem ägyptischen Anatomen Herophilus (325-280 v.Chr.). Galen (130-200 n.Chr.) bezeichnete es als Drüse, obwohl Funktion und Struktur von Drüsen zu dieser Zeit noch unbekannt waren. Vesalius (1514-1564) beschrieb Topographie und Beschaffenheit des Organs. Descartes (1596-1650) betrachtete die Zirbeldrüse als "rechte Hand" der Seele (zit. nach Zrenner 1985), und er vermutete schon Verbindungen der Augen zum Corpus pineale. De Graaf (1886), Korschelt und Spencer (zit. nach Studnicka 1905) waren die ersten Autoren, die zeigten, daß die Zirbeln von Amphibien und Reptilien photosensorische Organe sind.

Neuere Forschungen über die Funktion des Pinealorgans begannen im Jahre 1959, als aus 250 000 Rinderepiphysen das mutmaßliche Pinealhormon Melatonin isoliert und dessen Struktur aufgeklärt wurde (Lerner et al. 1959, Lerner und Case 1960).

Die Variabilität des Pinealkomplexes in Form, Größe, Lage, zytologischer Ausformung und Innervation ist ein Charakteristikum dieses Organs. Bei einer phylogenetischen Betrachtung des Wandels der Epiphyse fällt besonders die sukzessive Reduktion der photorezeptiven Außenglieder des Pinealozyten (Oksche et al. 1971, Oksche und Hartwig 1979, Hartwig und Oksche 1981) im Laufe der Stammesgeschichte auf. Photorezeptive Zellen, die mit zapfenähnlichen Außengliedern ausgestattet sind, können im Pinealkomplex der Fische, der Amphibien und im Parietalauge der Reptilien nachgewiesen werden. Reduzierte, aber zur direkten Lichtrezeption noch befähigte Außengliederstrukturen besitzen die Pinealozyten der Vögel, während den Pinealozyten der Säugerepiphyse diese Strukturen fehlen.



Umfassende Darstellungen der Aspekte der heutigen Epiphysenforschung finden sich bei Ariens Kappers (1960), Wurtman et al. (1968), Quay (1974), Relkin (1976), Reiter (1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982), Vollrath (1981), Oksche und Pévet (1981) und Ueck (1982).

In den folgenden Ausführungen werden schwerpunktmäßig die an Ratten experimentell gefundenen Ergebnisse dargestellt.

1.1. Morphologische Grundlagen

Die große Variabilität des Pinealorgans in Form, Größe und Lage hat zu einer Typisierung und Klassifizierung durch Vollrath geführt (1979, 1981), die die oberflächliche Zirbel, den Stiel und den tiefen Anteil der Zirbeldrüse, auch Lamina intercalaris genannt, umfaßt. Das Pinealorgan der Ratte (Klassifizierung nach Vollrath: $\alpha\beta C$) zeigt intraspezifische Unterschiede, die vor allem den Stiel betreffen (Boeckmann 1980). In der weitaus größten Anzahl der Fälle ist jedoch die oberflächliche Zirbel mit der Lamina intercalaris durch einen Stiel verbunden, der überwiegend aus Blutgefäßen, Nervenfasern und begleitendem Gewebe besteht.

Die Größe des oberflächlichen Teils beträgt bei der Ratte zwischen 1,6 und 1,9 mm in der Länge, bei einem maximalen Durchmesser von 0,8 mm, sein Gewicht beträgt 1-1,5 mg. Die oberflächliche, linsenförmige Zirbel liegt, zwischen Cortex cerebri und Cerebellum, basal der Lamina quadrigemina auf und ist mit dem Tentorium cerebelli bindegewebig verwachsen.

Die Blutversorgung erfolgt durch Äste der Arteria choroidea posterior. Über die Vena cerebri magna, den Sinus sagittalis superior, den Confluens sinuum und die Sinus transversi erfolgt der Blutabfluß und der Sekretabtransport. Die Drüse besteht

überwiegend aus Pinealozyten (82%) und Astrozyten (12%, Wallace et al. 1969). Pinealozyten besitzen Fortsätze verschiedener Form und Größe.

Es wird angenommen, daß sich der rein sekretorische Pinealozyt der Säugetiere aus dem photoneuroendokrinen Pinealozyten entwickelt hat (z.Ü. Collin und Oksche 1981, Meinzel 1981). Andere Autoren bezeichnen den Pinealozyten als "Paraneuron" aufgrund seiner morphologischen, physiologischen und biochemischen Ähnlichkeit mit Nervenzellen (Fujita 1976, Ueck und Wake 1977). Axelrod (1974) bezeichnet die Epiphysis cerebri als "neuroendocrine transducer", der eine neuronale Information in ein hormonelles Signal umsetzt.

In den Zellen findet man relativ wenig rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum, jedoch relativ viele Golgi-Apparate. Mitochondrien kommen in sehr verschiedenen Formen und Größen vor und können bei der Ratte beträchtliche Ausmaße erreichen (4-5,8 μm).

Besonders interessante Strukturen in den Pinealozyten sind die sogenannten "synaptic ribbons" und "synaptic spherules".

1.1.1. "Synaptic ribbons", "synaptic spherules"

Als "synaptic ribbons" werden elektronendichte Stäbchen bezeichnet, die von hellen Bläschen umgeben sind. Der Durchmesser der Stäbchen und der hellen Vesikel beträgt zwischen 30 und 50 nm (Karasek 1983, z.Ü. Vollrath 1981). Außerdem gibt es rosettenähnliche Strukturen aus elektronendichtem Kern mit einem Durchmesser von 120-180 nm und rundumliegenden hellen Vesikeln, die als "synaptic spherules" bezeichnet werden (Karasek und

Vollrath 1982). "Synaptic spherules" werden bei der Ratte allerdings sehr selten beobachtet.

"Synaptic ribbons" kommen auch in der Retina (Sjöstrand 1958, Dowling und Boycott 1966), im Cortischen Organ (Smith und Sjöstrand 1961) und im Gleichgewichtsorgan (Wersäll et al. 1965) vor, wo sie allem Anschein nach der interzellulären Erregungsübertragung dienen.

Eine Analyse der topographischen Beziehungen der "ribbons" zeigte, daß beim Meerschweinchen 93,1 % benachbart zu anderen Pinealozyten liegen und 5,3 % in der Nähe von Blutgefäßen; nur 1,3 % der "ribbons" liegen gegenüber Nervenfasern (Vollrath 1973). Der überwiegende Teil der "synaptic ribbons" wird in den Zellfortsätzen gefunden.

"Synaptic ribbons" treten einzeln oder in Gruppen von mehreren "synaptic ribbons" auf, die als "ribbon fields" bezeichnet werden. Eine Ansammlung von "synaptic ribbons", die sich in benachbarten Pinealozyten an der Zellmembran gegenüberliegen, wird "paired ribbon field" genannt (Vollrath 1986).

Die Reaktionen der "synaptic ribbons" und der "synaptic spherules" unter physiologischen und experimentellen Bedingungen sind äußerst vielfältig und zwischen den Arten verschieden.

Die Anzahl der "synaptic ribbons", die einzeln und in Gruppen auftreten, unterliegt in der Zirbeldrüse einem 24-Stundenrhythmus mit einem Anstieg in der Nacht und einem Abfall am Tag (Vollrath 1973, Kurumado und Mori 1977, Karasek und Vollrath 1982, Karasek et al. 1982, Matsushima et al. 1983, Vollrath et al. 1983, Martinez Soriano et al. 1984). Bei Ratten zeigen "synaptic ribbons" und "synaptic spherules" übereinstimmendes Verhalten (Karasek und Vollrath 1982, Kosaras et al. 1983 a, b), während bei Meerschweinchen "synaptic ribbons" und "synaptic spherules" gegensätzliche Tag/Nacht-Rhythmen durchlaufen (Vollrath et al. 1983). In Pinealozyten aus Organkulturen zeigt sich dieser Tag/Nacht-Rhythmus nicht (Karasek und Vollrath 1982).

Bei Meerschweinchen, die unter Dauerlicht gehalten wurden,

nahmen die "synaptic ribbons" an Zahl zu (Lues 1971, Vollrath und Huss 1973), während die "synaptic spherules" an Zahl abnahmen (Vollrath 1986). Nach bilateraler Ganglionektomie erfolgte bei Kaninchen zuerst ein Anstieg der "synaptic spherules" und erst danach eine Vermehrung der "synaptic ribbons" (Romijn 1975). Bei der Ratte zeigte sich nach bilateraler Ganglionektomie (King und Dougherty 1982 a) ein Abfall der "synaptic ribbons" nach 12-24 Stunden. 72 Stunden später konnte kein Unterschied mehr zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Im weiteren Zeitverlauf waren die Werte der operierten Tiere dann größer als die der Kontrolltiere.

Elektrische Stimulation des Ganglion cervicale superius mit anschließender Quantifizierung der "synaptic ribbons" wurde bisher nur bei der Katze beschrieben (Gonzales und Alvarez-Uria 1986), wobei sich ein etwa fünffacher Anstieg der Anzahl der "synaptic ribbons" ergab.

Die bisher erhobenen Befunde über die Reaktionen der "synaptic ribbons" und "synaptic spherules" unter verschiedenen Bedingungen lassen eine Klärung der Funktion dieser Strukturen in der Zirbeldrüse noch nicht zu.

1.2. Biochemie des Pinealkomplexes

In Pinealozyten sind histochemisch und biochemisch vor allem biogene Indolamine, aber auch Lipide, Aminosäuren, Peptide, Polypeptide und Proteine nachgewiesen worden (z.Ü. Vollrath 1981).

Die Synthese von Melatonin in der Zirbeldrüse (Abbildung 1) ist ein wichtiger Stoffwechselweg, der bei bisher allen untersuchten Säugern, mit Ausnahme von Labormäusen (Ebihara et al. 1986), in identischer Weise nachgewiesen werden konnte.

Der intrazellulären Aufnahme des Tryptophans aus dem Blut

folgt die Umwandlung zu 5-Hydroxytryptamin, die durch die beiden Enzyme Tryptophanhydroxylase und die Decarboxylase aromatischer Aminosäuren katalysiert wird. Das 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) wird durch die Serotonin-N-Acetyltransferase (NAT:EC 2.3.1.5.) umgesetzt zu N-Acetylserotonin, woraus unter dem enzymatischen Einfluß der Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT:EC 2.1.1.4.) Melatonin wird (z.Ü. Vollrath 1981).

Die Konzentration des Melatonins (Wurtman et al. 1968, Goldman et al. 1981, Vollrath und Welker 1984) weist eine dem Serotonin (Quay 1963, 1964, Snyder 1965) gegenläufige Rhythmik auf, mit nächtlichen Maxima und niedrigen Tagwerten.

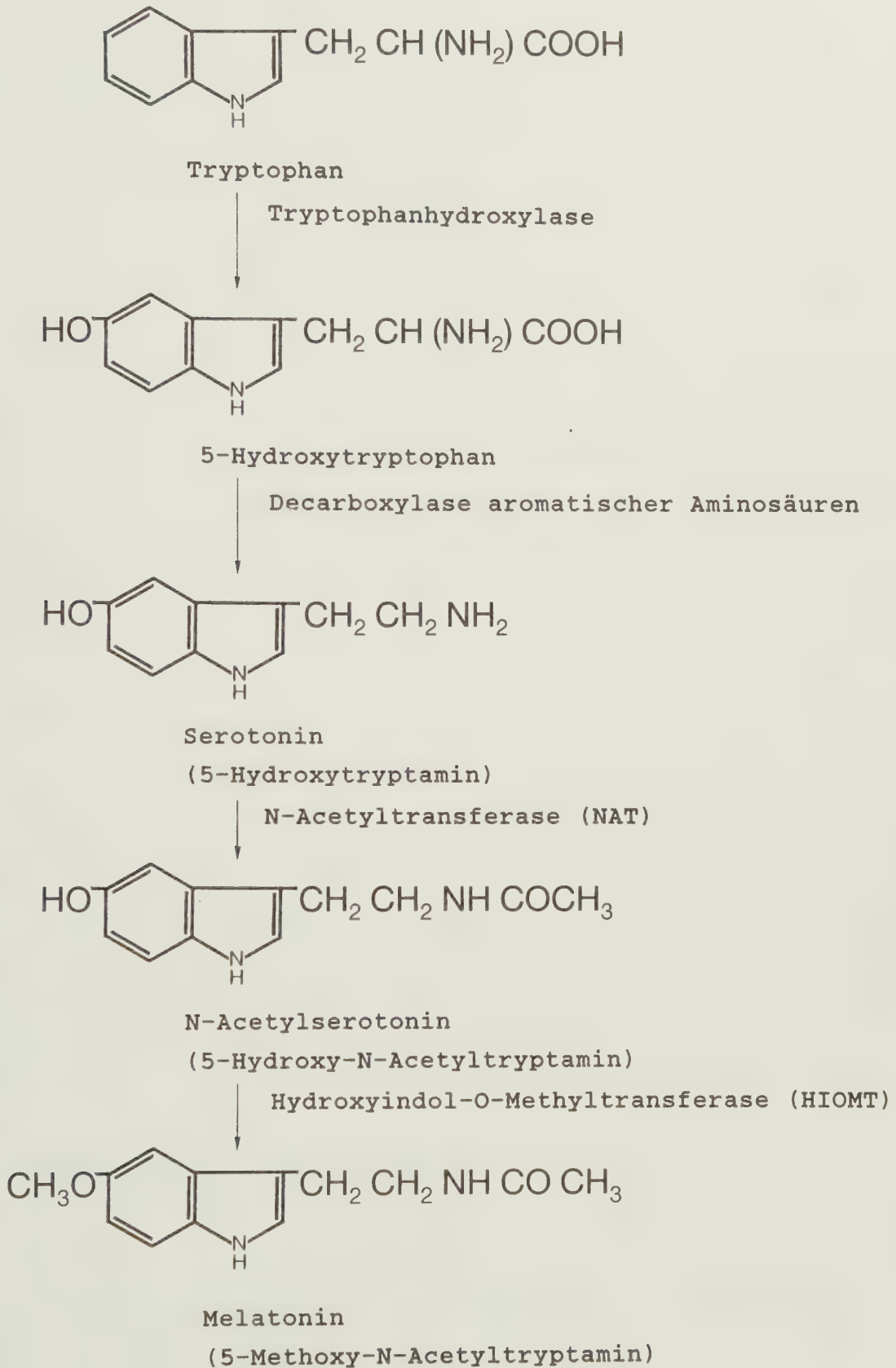
Die NAT-Aktivität zeigt bei der Ratte einen Rhythmus mit niedrigen Werten am Tag und 50-100 mal höheren Nachtwerten (Klein und Weller 1970, Deguchi 1975, Rudeen et al. 1975).

Nach präganglionärer elektrischer Stimulation der sympathischen Nervenfasern an den oberen Halsganglien, während des Tages oder bei Nacht, steigt die NAT-Aktivität der Zirbeldrüse statistisch signifikant an (Volkman und Heller 1971, Bowers und Zigmond 1980, 1982).

Eine früher beschriebene nächtliche Erhöhung der HIOMT-Aktivität bei Ratten (Axelrod et al. 1965) konnte später nicht mehr nachgewiesen werden (Quay 1967, Merrit und Sulkowsky 1969), so daß nach heutiger Meinung ein circadianer Rhythmus der HIOMT-Aktivität nicht gegeben ist. Das Enzym NAT wird neben Serotonin und Melatonin zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität in der Zirbel herangezogen, da es ebenfalls circadiane Schwankungen aufweist. Diese Rhythmen sind endogen, wie der Anstieg des Serotoningehaltes bereits am Ende der Dunkelperiode oder der Abfall vor Eintritt der Dunkelheit zeigt. Die Periodendauer dieser Rhythmen wird aber durch Licht synchronisiert.

Am Ende der Hellperiode wird über den vom Lichtzyklus abhängigen Sympathikotonus eine vermehrte Noradrenalinabgabe aus den postganglionären sympathischen Nervenendigungen im Bereich der Epiphysis cerebri induziert. Noradrenalin wirkt auf die

Abbildung 1: Synthese des Melatonins aus Tryptophan



Pinealozyten über α - und β -adrenerge Rezeptoren. Die Aktivierung der β -Rezeptoren führt bei der Ratte über die Vermittlung von Adenylatcyclase zu einem sechzigfachen Anstieg von cAMP und zu einer Verdoppelung der cGMP-Produktion. Werden auch α -adrenerge Rezeptoren von Noradrenalin besetzt, wird die β -adrenerge Stimulation von cAMP um das zehnfache und die Produktion von cGMP um das zweihundertfache gesteigert (Strada et al. 1972, Vanecek et al. 1985, z.Ü. Klein 1985).

Es gibt Befunde die darauf hindeuten, daß die Melatoninsynthese über die Wirkung von cAMP auf NAT gesteuert wird (Klein und Weller 1973, Klein et al. 1978), während die Funktion von cGMP noch nicht geklärt ist (z.Ü. Klein 1985). Die HIOMT-Aktivität wird, so weit es bisher bekannt ist, ausschließlich über β -adrenerge Rezeptoren reguliert (Sudgen und Klein 1983 a,b,c).

1.3. Innervation

Die Zirbeldrüse wird nicht nur von sympathischen Nervenfasern, sondern auch zentral innerviert (z.Ü. Korf und Möller 1984). Eine parasympathische Innervation ist bei der Ratte im Gegensatz zum Kaninchen (Romijn 1975) bisher nicht nachgewiesen worden. Neuere Befunde zeigen (Shiotani et al. 1986), daß bei der mongolischen Wüstenspringmaus Fasern vom Ganglion trigeminale und vom Ganglion pterygopalatinum die Zirbeldrüse erreichen (Abbildung 2).

1.3.1. Sympathische Innervation

Die Zirbel wird von postganglionären sympathischen Nervenfasern, deren Zellkörper in den beiden Ganglia cervicalia superiora liegen, versorgt (Bowers et al. 1984 b). Die prä-

ganglionären Fasern entspringen den Rückenmarkssegmenten C8-T5 (Rando et al. 1981). Die meisten der Nervenfasern treten als paarige Nervi conarii an der dorsolateralen Fläche in die Zirbel ein, während ein kleinerer Teil Blutgefäße begleitet (Kappers 1960, Wurtman et al. 1968).

1.3.2. Zentrale Innervation

Zentrale Nervenfasern aus epi- und hypothalamischen Kerngebieten erreichen die tiefe Zirbel über die Commissura habenu-
larum und die Commissura posterior und gelangen dann über den Stiel in den oberflächlichen Teil der Zirbeldrüse (z.Ü. Korf und Møller 1984).

1.3.3. Photoneurale Regulation der Zirbeldrüse

Bei allen bisher untersuchten Säugern (Moore-Ede et al. 1982) konnte nachgewiesen werden, daß die an den Photorezeptoren der Retina perzipierte Tagesperiodik die Zirbeldrüse über einen komplexen polysynaptischen Weg erreicht: Über den retinohypothalamischen Trakt erreichen die neuronalen Signale die Nuclei suprachiasmatici des Hypothalamus (Moore und Klein 1974).

Bei den Säugern gilt der Nucleus suprachiasmaticus als "biologische Uhr" (Moore und Klein 1974, Stetson und Watson-Whitmyre 1976, Rusak 1982), dessen Neurone unter anderem eine circadiane Periodik ihrer Entladungsparameter aufweisen, die auch in vitro weiterbesteht (Groos und Meijer 1985). Bei Vögeln wird die Zirbeldrüse als Teil des circadianen Schrittmachersystems angesehen (Menaker und Zimmerman 1976, Gwinner 1978).

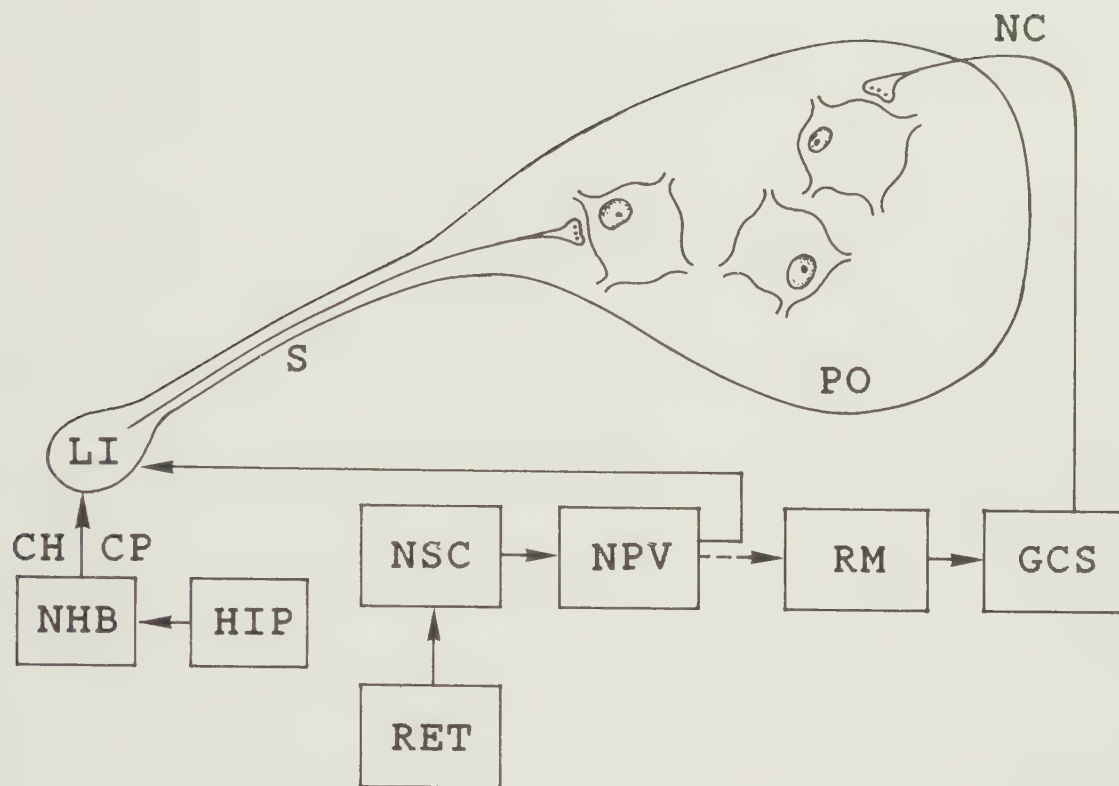


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Innervation des Pinealorgans

CH - Commissura habenularum	RM - Rückenmark
CP - Commissura posterior	GCS - Ganglion cervicale superius
NHB - Nucleus habenularis	NC - Nervus conarius
HIP - Hippocampus	PO - Pinealorgan
NSC - Nucleus suprachiasmaticus	S - Stiel
RET - Retina	LI - Lamina intercalaris
NPV - Nucleus paraventricularis	

Von den Nuclei suprachiasmatici ziehen Fasern zu den Nuclei paraventriculares (Berk und Finkelstein 1981, Stephan et al. 1981). Durch Läsion der Nuclei paraventriculares wird der Rhythmus der Melatoninbildung gestört (Klein et al. 1983), während Stimulation eine Verminderung der nächtlichen Melatoninsynthese bewirkt (Reuss et al. 1985). Diese Befunde sprechen dafür, daß die Nuclei paraventriculares auch in den multisynaptischen Weg von der Retina zur Zirbeldrüse eingeschaltet sind. Von den Nuclei paraventriculares über das mediale Vorderhirnbündel führen die Fasern zum Thorakalmark, von wo aus präganglionäre sympathische Fasern zum Ganglion cervicale superius ziehen.

1.4. Funktionelle Aspekte

Außer Melatonin, dem bisher in der Zirbelforschung die größte Aufmerksamkeit zugewandt wurde, gibt es in der Zirbeldrüse auch noch andere Indolamine, sowie Arginin-Vasotocin, hypothalamische Releasing-Hormone und bisher nicht identifizierte Peptide niedrigen Molekulargewichts (z.Ü. Vollrath 1981, Vaughan 1984).

Untersuchungen an Schafen und Ratten weisen daraufhin, daß pineales Melatonin an die Blutbahn abgegeben und nicht direkt in den 3. Ventrikel sezerniert wird (Rollag et al. 1978, Withyachumnarnkul und Knigge 1980). Da Plasmamelatoninwerte parallel zu den innerepiphysären laufen, scheint es eine größere Speicherung von Melatonin nicht zu geben (Illnerova et al. 1978).

Ein wichtiger Angriffspunkt von pinealen Substanzen ist der Hypothalamus (Cardinali 1974). Intravenös oder in den Liquor cerebrospinalis injiziertes Melatonin häuft sich im Hypothalamus an (Wurtman et al. 1964, Anton-Tay und Wurtman 1969, Cardinali et al. 1973) und induziert eine Anzahl metabolischer Veränderungen, eingeschlossen eine Erhöhung von Serotonin

(Anton-Tay et al. 1968) und Gammaaminobuttersäure (z.Ü. Anton-Tay 1971), eine Reduktion der Proteinsynthese (Cardinali et al. 1974) und des mikrotubulären Proteins (Cardinali und Freire 1975). Ebenso wird ein Einfluß der Zirbeldrüse auf die Bildung von Prolactin, adrenocorticotropem Hormon, thyreotropem Hormon, follikelstimulierendem Hormon, luteinisierendem Hormon und melanocytenstimulierendem Hormon vermutet (z.Ü. Vollrath 1981).

Bei einigen Säugetierspezies steht der Einfluß des Pinealorgans auf die Gonadenfunktion im Mittelpunkt der Untersuchungen. Melatonin reguliert bei Säugetieren mit saisonalem Fortpflanzungsverhalten, wie dem Hamster und dem Schaf, abhängig von den jahreszeitlich unterschiedlichen Tageslängen, die Gonadenfunktion (Reiter et al. 1976, Goldman et al. 1982). Mit Beginn des Herbstes zeigen syrische Hamster eine sexuelle Ruhephase mit Gonadenatrophie. Im Frühjahr kehrt sich dieser Prozeß um, die sexuell aktive Phase fällt in den Sommer. Entfernt man diesen Tieren die Zirbeldrüse, so bleibt die Gonadenatrophie aus. Die biologisch wirksame Substanz ist dabei das Melatonin. Es ist aber auch nachgewiesen worden, daß Melatonin nicht nur antigonadotrope Wirkung hat (Reiter 1980). Bei Schafen wirkt es progonadotrop, so daß durch Melatoningaben die Fortpflanzungszeit vorverlegt werden kann (Arendt et al. 1983).

Bei Fischen wird das Pinealorgan mit der Regulation des Farbwechsels, der Phototaxis, der lokomotorischen Aktivität und der Gonadenfunktion in Verbindung gebracht (Ueck 1974). Bei Reptilien und Vögeln wird vor allem ein Einfluß auf die lokomotorische Aktivität diskutiert, wobei die photosensitive Epiphyse der Reptilien auch entscheidend in die Thermoregulation involviert ist (Heldmaier et al. 1985).

Exogene Melatoninzufuhr und Pinealektomie zeigen einen Einfluß auf das Gewicht der Nebennierenrinde und die Sekretion von Gluko- und Mineralokortikoiden (Reiter 1983).

Melatonin wird in vielen menschlichen Körperflüssigkeiten gefunden, z.B. Blut, Liquor cerebrospinalis, Lymphflüssigkeit

und Urin. Der 24-Stundenrhythmus der Konzentration gleicht dem anderer Säuger mit niedrigen Tageswerten (10-40 pg/ml) und hohen Nachtwerten (60-120 pg/ml). Ebenso wurden jährliche Schwankungen mit Maxima im Januar und Juli und einem Tief im April und Oktober nachgewiesen (Arendt et al. 1978). Beim Menschen wird aber weder die Gonadotropin- noch die Prolactinsekretion durch Melatonin beeinflusst. Die Profile der Pinealenzyme Erwachsener, pubertätlicher oder kindlicher Personen zeigen keine signifikanten Unterschiede (Ehrenkranz et al. 1982). Ältere Menschen haben geringe Tag/Nacht-Differenzen bei niedrigen Serumspiegeln (Iguchi et al. 1982).

Depressive und schizophrene Patienten haben relativ niedrigere nächtliche Melatoninmaxima (Ferrier et al. 1982), ebenso Untergewichtige (Arendt et al. 1982) und Patienten mit Cushing Syndrom infolge hypophysärer Überfunktion, während eine Störung des Melatoninmetabolismus bei der Leberzirrhose oder organische Veränderungen der Zirbeldrüse selbst (Barber et al. 1978), z.B. Pinealistumoren, den Serummelatoninspiegel beträchtlich erhöhen (z.Ü. Wetterberg 1983).

1.5. Problemstellung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden durchgeführt, um Daten über die möglichen Auswirkungen elektrischer Stimulation am Ganglion cervicale superior auf Anzahl, Lage, Länge und Form der "synaptic ribbons" und auf die Aktivitäten der Enzyme NAT und HIOMT zu erhalten.

Eine Analyse der Anzahl der "synaptic ribbons" nach elektrischer Stimulation am Ganglion cervicale superius wurde bisher nur bei der Katze durchgeführt (Gonzales und Alvarez-Uria 1986). Es erschien daher interessant, die an der Katze

gewonnenen Daten mit denen der Ratte zu vergleichen, um interspezifische Gemeinsamkeiten oder Unterschiede aufzudecken. Die Versuche fanden am Tag statt, da eine weitere Zunahme der hohen Nachtwerte der "synaptic ribbons" nicht wahrscheinlich erschien.

Bestimmungen der NAT-Aktivität nach Stimulation der oberen Halsganglien (Volkman und Heller 1971, Bowers und Zigmond 1980, 1982) wurden bisher nicht im Zusammenhang mit der Quantifizierung von "synaptic ribbons" durchgeführt.

Es wird vermutet, daß die circadiane Rhythmik der "synaptic ribbons" ebenso wie die Aktivität der Enzyme NAT und HIOMT durch die sympathische Innervation gesteuert wird. Da "synaptic ribbons" und Melatoninsynthese vergleichbare Tagesgänge haben, wurde in dieser Arbeit auch eine Untersuchung über eine Korrelation der Anzahl der "synaptic ribbons" mit der Aktivität des Enzyms NAT durchgeführt.

2. Material und Methodik

2.1. Präparation der Versuchstiere

Für die Untersuchung wurden 18 männliche, adulte Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 380 g verwendet.

Die Tiere wurden vorher einige Wochen zu viert in Macrolon-käfigen bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % gehalten. Die Beleuchtungsverhältnisse unterlagen einem 12 Stundenrhythmus (LD 12:12 mit Dauer der Lichtphase von 07.00-19.00 Uhr, Leuchtstoffröhren Osram C 65/25 weiß universal, 300 Lux, gemessen am Boden der Käfige). Den Versuchstieren stand Futter (Altromin®) und Wasser nach Belieben zur Verfügung.

An drei Versuchstagen wurden zwischen 10.00 Uhr und 14.00 Uhr jeweils 6 Tiere, nach initialer, leichter Chloräthyläthernarkose, mit Tribromethanol (0,3 g/kg Körpergewicht) intraperitoneal betäubt. Operative Eingriffe wurden an vier von diesen sechs Tieren vorgenommen. Zwei Tiere dienten jeweils als Kontrollen. Nach einem medianen cervicalen Hautschnitt wurde das Ganglion cervicale superius unter der Bifurkation der Arteria carotis communis dargestellt und den Tieren bilateral Elektroden am Ganglion angelegt.

Je zwei Tiere wurden zwei Stunden lang mit 0,5 mA und 10 Hz elektrisch stimuliert (Signale in Form monophasischer Rechtecke mit 0,5 ms Dauer). Die Reizparameter wurden bestimmt in Annäherung an bereits durchgeführte Untersuchungen (Volkman und Heller 1971, Bowers und Zigmond 1980, 1982, Gonzales und Alvarez-Uria 1986). Die anderen beiden Tiere wurden scheinstimuliert, d.h. die Reizelektroden wurden nach Implantation nicht an den Impulsgeber angeschlossen. Nach zwei Stunden wurden alle Tiere dekapitiert und die Zirbeldrüse entnommen.

2.2. Bestimmung der Serotonin-N-Acetyltransferase- und Hydroxyindol-O-Methyltransferase-Aktivität

Zwei Drittel der Zirbeldrüse wurden bis zur Bestimmung der NAT- und HIOMT-Aktivität in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte mit radioenzymatischen Methoden (NAT: Deguchi und Axelrod 1972, HIOMT: Axelrod und Weissbach 1961) innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme der Zirbel. Der Proteingehalt des Zirbeldrüsenteils wurde bestimmt nach der Methode von Lowry et al. (1951) und die Enzymaktivität angegeben in pmol/ μ g Protein $\cdot$ h.¹⁾

2.3. Untersuchung der "synaptic ribbons"

Das andere Drittel der entnommenen Zirbel wurde nach Karnovsky (1965: 4 % Paraformaldehyd, 5 % Glutaraldehyd 0,1 m Na-Phosphatpuffer (Sörensen), pH 7,4) fixiert. Nach Auswaschen in 0,1 m Sörensenpuffer mit 4,266 % Saccharose wurden die Zirbelteile mit 2 % OsO₄ in 0,1 m Sörensenpuffer nachfixiert, und anschließend in Pufferlösung ausgewaschen. Der Gewebsblock wurde in 70 % Aceton mit 0,5 % Uranylacetat und 1 % Phosphorwolframsäure kontrastiert, entwässert und in Epon eingebettet. Danach wurden Ultradünnschnitte (Reichert Ultracut) angefertigt, auf Kupfernetze mit 300 Maschen aufgezogen, zuerst 10 Minuten lang mit 8 % Uranylacetat in wässriger Lösung gefärbt und anschließend 5 Minuten mit Bleicitrat nach Reynolds (1963) behandelt.

¹⁾ Enzym- und Proteinbestimmungen wurden von Dr. Stefan Reuss, Anatomisches Institut Mainz, durchgeführt.

Die Netze wurden so codiert, daß der Untersucher nicht wußte, ob er stimuliertes, scheinstimuliertes oder Kontrollmaterial auswertete.

Zur Auszählung der "synaptic ribbons" mit dem Zeiss 10 Elektronenmikroskop wurden sechs, nach Möglichkeit nebeneinander liegende, vollständig mit Gewebe bedeckte Maschen eines Kupfernetzes ausgewählt. Oben links in der Ecke beginnend, wurde das Feld bei sechzehntausendfacher Vergrößerung durchgemustert. Eine Öffnung mißt $65 \times 65 \mu\text{m}$ ($= 4\,255 \mu\text{m}^2$), so daß von jedem Tier eine Schnittfläche von $25.350 \mu\text{m}^2$ Zirbelgewebe untersucht wurde. Die Anzahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields" und ihre Lokalisation innerhalb der Zellen (Fortsatz, Perikaryon, Kernnähe, Membrannähe) wurde erfaßt. Bei vierzigtausendfacher Vergrößerung wurde die Länge der "synaptic ribbons" mit dem Zeiss Morphomat gemessen. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, welche Strukturen in unmittelbarer Nachbarschaft der "synaptic ribbons" lagen. Bei jedem Tier wurde eine Fläche von $25.350 \mu\text{m}^2$ Zirbelgewebe ausgewertet. Die Angaben wurden umgerechnet auf $20.000 \mu\text{m}^2$ (=Untersuchungseinheit UE), um bessere Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Publikationen zu haben.

2.4. Statistische Verfahren

Um festzustellen, ob statistisch signifikante Unterschiede in der NAT- und HIOMT-Aktivität zwischen den Gruppen der Versuchstiere bestehen, wurde für beide Enzyme eine Varianzanalyse durchgeführt.

Mögliche statistische Unterschiede zwischen der Anzahl der "synaptic ribbons" in den einzelnen Versuchsgruppen sollten durch einen Vergleich der Zirbeldrüsen stimulierter und scheinstimulierter Tiere sowie von Kontrolltieren aufgedeckt werden.

Dazu wurden jeweils Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test und Kruskal-Wallis H-Test durchgeführt, und zwar sowohl für die Gesamtzahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields" in den ausgezählten Gewebsabschnitten als auch für die Zahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields" in den Perikarien und in Fortsätzen getrennt, um eventuelle signifikante Verschiebungen in der Lokalisation zu erfassen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen NAT- und HIOMT-Aktivität und der Anzahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields" wurde mit dem Spearman-Rang Korrelationskoeffizienten und einem t-Test für die Korrelation überprüft.

Außerdem wurde der lineare Korrelationskoeffizient berechnet und mit einem Stichproben t-Test für den Korrelationskoeffizienten abgesichert.

Darüber hinaus wurden noch die Mittelwerte $\pm$ SEM (Standard error of mean) der gemessenen NAT- und HIOMT-Aktivität, der Anzahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields" und der Länge der "synaptic ribbons" gebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Enzymaktivitäten

3.1.1. Serotonin-N-Acetyltransferase

Stimulierte Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren einen etwa dreifachen Anstieg der NAT-Aktivität. Es bestand ein signifikanter Unterschied stimulierter Tiere sowohl zu scheinstimulierten als auch zu Kontrolltieren ($p < 0,01$). Die NAT-Aktivität der scheinstimulierten Ratten unterschied sich nicht signifikant von der Aktivität der Kontrolltiere ($p > 0,05$, Tabelle 1).

Tabelle 1

NAT- und HIOMT-Aktivität der Zirbeldrüse von stimulierten Ratten, Scheinstimulierten und Kontrollen.

	NAT-Aktivität	HIOMT-Aktivität
Kontrollen	1,97 ± 0,55 ^a	1,40 ± 0,66
Scheinstimulation	2,30 ± 0,36 ^b	1,46 ± 0,88
Stimulation	6,71 ± 0,98 ^c	1,28 ± 0,67

Angaben in pmol/ μ g Protein · h, Mittelwert ± SEM

a versus c, $p < 0,01$

b versus c, $p < 0,01$

3.1.2. Hydroxyindol-O-Methyltransferase

Die HIOMT-Aktivität zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen und lag bei allen drei Gruppen auf etwa gleicher Höhe (Tabelle 1).

3.2. Untersuchung der "synaptic ribbons"

3.2.1. Anzahl und intrazelluläre Verteilung

Insgesamt wurden 242 "synaptic ribbons" gezählt, die in 170 Gruppen lokalisiert waren. Die einzelnen Gruppen enthielten bis zu 7 "synaptic ribbons", wobei die Gruppe der einzeln auftretenden "ribbons" die weitaus größte war (Abbildung 6).

93,2 % der "synaptic ribbons" erschienen längs angeschnitten und nur 6,8 % quer. Daneben wurden noch 5 mehr viereckige, 9 gebogene synaptische Strukturen und 2 "synaptic spherules" beobachtet. Typische Beispiele sind in den Abbildungen 3, 4, 5, und 7 gezeigt.

Der Mittelwert der Anzahl der SR/UE zeigte zwischen den stimulierten Ratten ($14,98 \pm 2,65/\text{UE}$) und den Kontrollen ($14,59 \pm 4,25/\text{UE}$) keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Auch die Änderung der "ribbon fields"/UE (Stimulation $10,25 \pm 1,60$; Scheinstimulation $10,78 \pm 1,44$; Kontrollen $11,26 \pm 2,72$) lag unterhalb der Signifikanzgrenze ($p > 0,05$, Tabelle 2).

Die Analyse der intrazellulären Lokalisation ergab, daß bei den Stimulierten 73 %, bei den Scheinstimulierten 70 % und bei Kontrolltieren 74 % der "synaptic ribbons" im Fortsatz lagen. Die meisten der "synaptic ribbons" lagen in der Nähe der Zell-

membran (Kontrollen 93,4 %, Scheinstimulation 96,3 %, Stimulation 93,8 %). Eine statistisch signifikante Verschiebung der intrazellulären Lokalisation, nach Stimulation, zwischen Fortsatz und Perikaryon war nicht nachzuweisen ($p > 0,05$, Abbildung 6).

Tabelle 2

Anzahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields".
Mittelwert $\pm$ SEM/20.000

	synaptic ribbons	ribbon fields
Kontrollen	14,59 $\pm$ 4,25	11,26 $\pm$ 2,72
Scheinstimulation	15,51 $\pm$ 2,65	10,78 $\pm$ 1,44
Stimulation	14,98 $\pm$ 2,58	10,25 $\pm$ 1,60

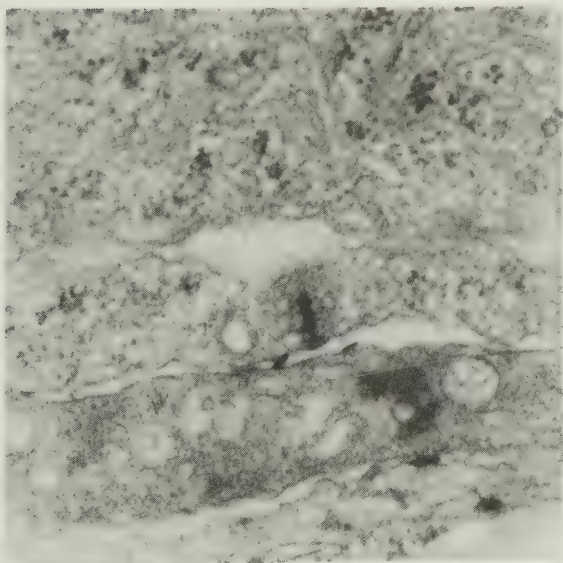


Abbildung 3
"Synaptic ribbon",
längsgeschnitten
an der Zellmembran.
Vergr. 40.000

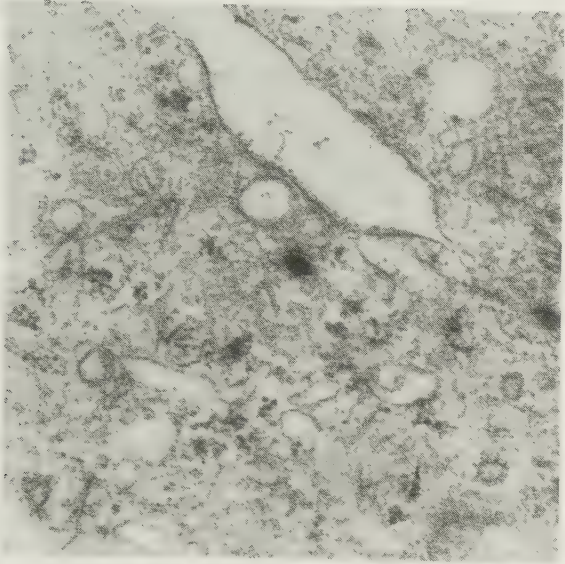


Abbildung 4
"Synaptic ribbon",
quergeschnitten.
Vergr. 40.000

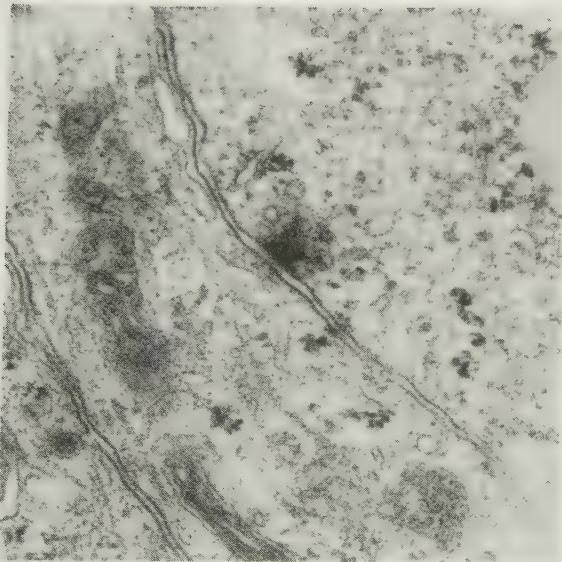
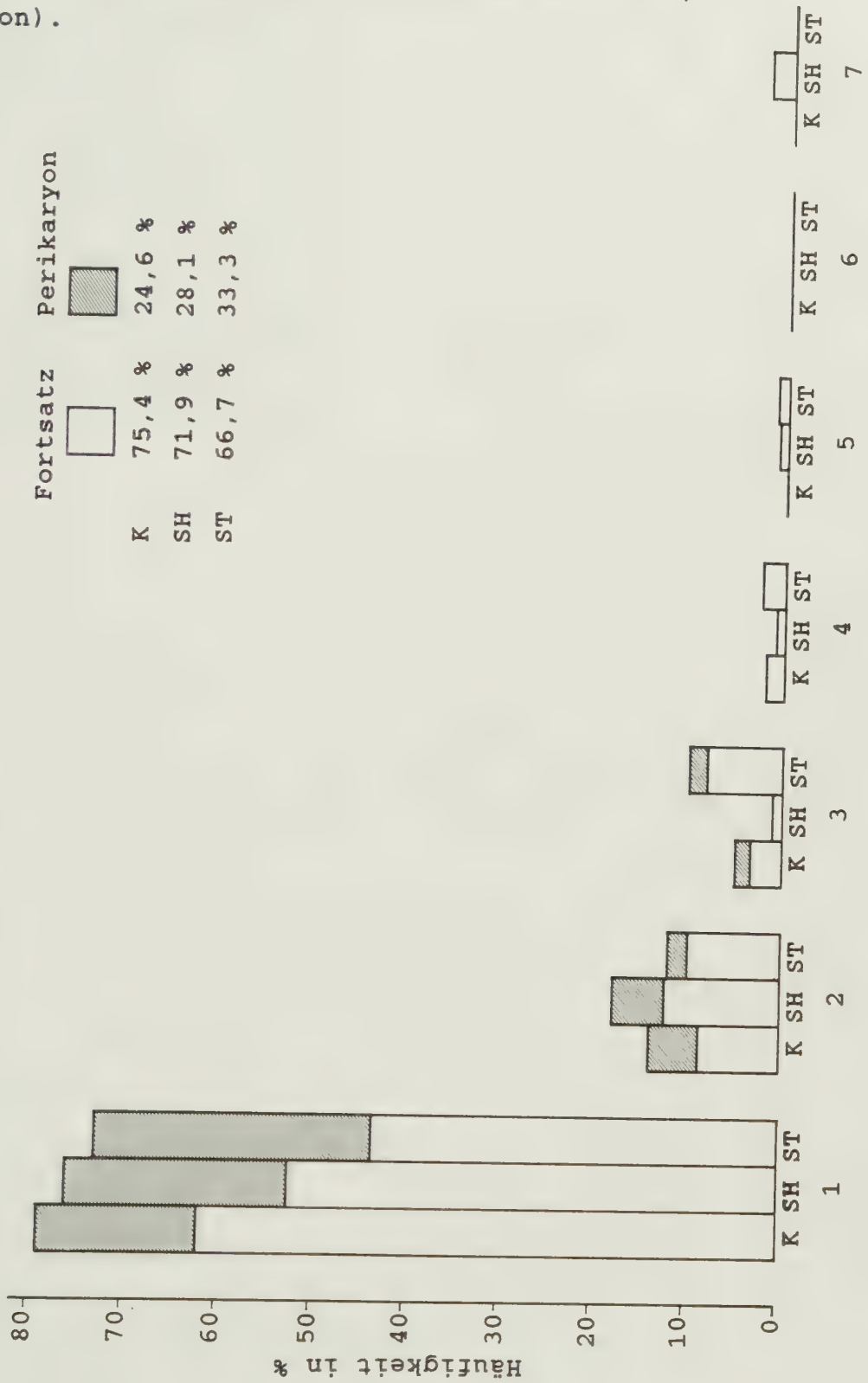


Abbildung 5
Unregelmäßige
synaptische Struktur.
Vergr. 40.000

Abbildung 6

Anzahl der "synaptic ribbons"/"ribbon fields" im Fortsatz und im Perikaryon (K-Kontrollen, SH-Scheinstimulation, ST-Stimulation).



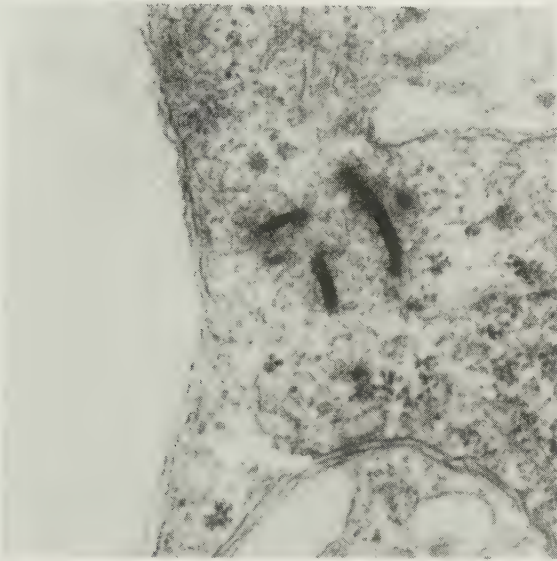


Abbildung 7
Gruppe von
"synaptic ribbons".
Vergr. 40.000

3.2.2. Länge

Die mittlere Länge und die Standardabweichung der "synaptic ribbons" ist in Tabelle 3 dargestellt.

Die Daten ergeben, daß die mittlere Länge der "synaptic ribbons" keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zeigte ($p > 0,05$).

Tabelle 3

	Mittelwert		SEM
Kontrollen	251,9	±	13,4 nm
Scheinstimulation	216,8	±	10,6 nm
Stimulation	217,1	±	9,2 nm

Die Länge der "synaptic ribbons" streute sehr stark. Die Werte schwankten zwischen 81 und 910 nm (Abbildung 8).

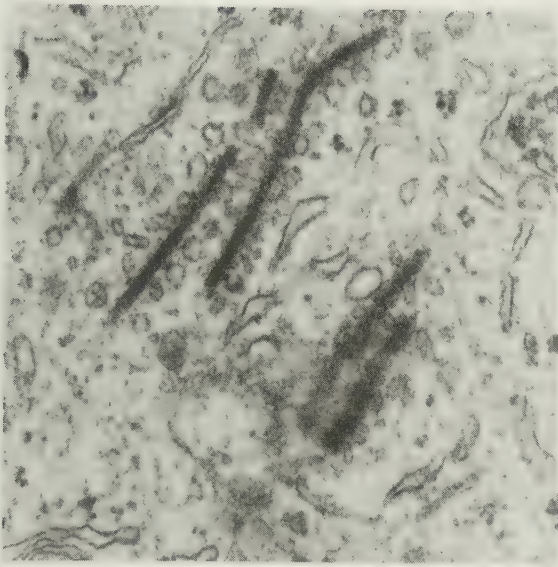


Abbildung 8

"Synaptic ribbon",

910 nm lang.

Vergr. 40.000

3.2.3. Topographische Beziehungen

Es zeigte sich, daß bei den drei Gruppen der weitaus größte Anteil der "synaptic ribbons" benachbart von anderen Pinealozyten lag (Kontrollen 86,4 %, Scheinstimulation 79,8 %, Stimulation 80,0 %), der Rest in der Nähe von Nervenfasern (Kontrollen 2,3 %, Scheinstimulation 11,3%, Stimulation 3,0 %) und von Blutgefäßen (Kontrollen 4,6 %, Scheinstimulation 5,2 %, Stimulation 10,5 %, Tabelle 4). Die Abbildungen 9 und 10 zeigen Gruppen von "synaptic ribbons", die in der Nähe von Nervenfasern liegen.

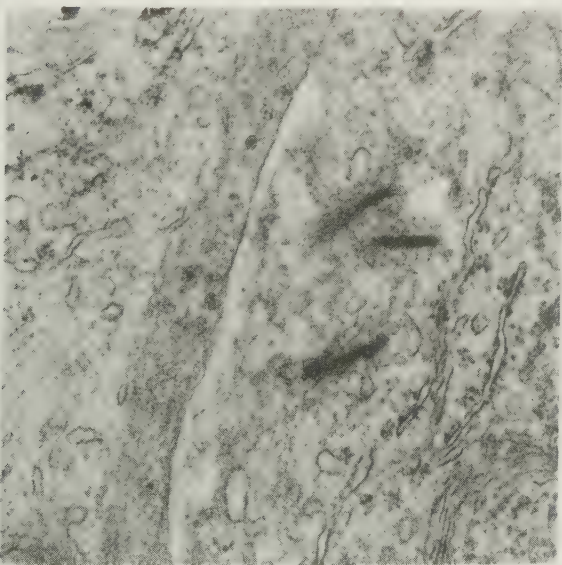


Abbildung 9

Gruppe von "synaptic ribbons" in der Nähe von Nervenfasern.

Vergr. 40.000

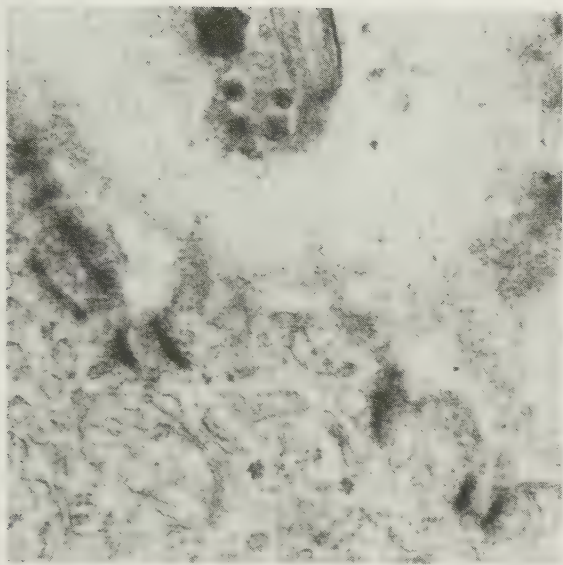


Abbildung 10
Gruppen von "synaptic ribbons" in der Nähe von Nervenfasern.
Vergr. 40.000

Tabelle 4

Nachbarschaftsbeziehungen der "synaptic ribbons", aufgegliedert nach ihrer Lage im Fortsatz und im Perikaryon.
Angaben in Prozent (Anzahl).

intra- zelluläre Loka- lisation	topographische Beziehungen					
		Fortsatz	Peri- karyon	Blut- gefäße	Nerven	Kern- nähe
Fortsatz	Kontrollen	62,7(27)	23,3(10)	9,3(4)	4,7(2)	-
	Scheinstim.	59,1(39)	22,7(15)	3,0(2)	15,2(10)	-
	Stimulation	66,7(44)	18,2(12)	9,1(6)	6,0(4)	-
Perikaryon	Kontrollen	60,1(9)	26,7(4)	-	-	13,2(2)
	Scheinstim.	44,5(12)	33,3(9)	7,4(2)	7,4(2)	7,4(2)
	Stimulation	54,2(13)	20,8(5)	12,5(3)	-	12,5(3)

3.2.4. Lage zur Zellmembran

Interessant waren auch die Beobachtungen in Bezug auf den Winkel, in dem die "synaptic ribbons" zur Zellmembran lagen. Bei den "synaptic ribbons" mit Membranberührung stand der größere Teil (Kontrollen 58 %, Scheinstimulation 61 %, Stimulation 69 %) fast senkrecht der Membran auf. Die anderen bildeten einen mehr oder weniger großen Winkel mit der Zellmembran. In der Membrannähe ergibt sich ein etwas anderes Bild (Tabelle 5). Hier konnte außerdem ein recht großer Anteil der "synaptic ribbons", die parallel zur Zellmembran lagen, beobachtet werden (Abbildungen 11, 12, 13).

Je ein "paired ribbon field" - eine Ansammlung von "synaptic ribbons", die sich in benachbarten Pinealozyten an der Zellmembran gegenüberliegen - wurde in allen drei Versuchsgruppen beobachtet (Abbildungen 14, 15). Vereinzelt wurden größere Mitochondrien und Fettvakuolen in der Nähe der "ribbon fields" gesehen.

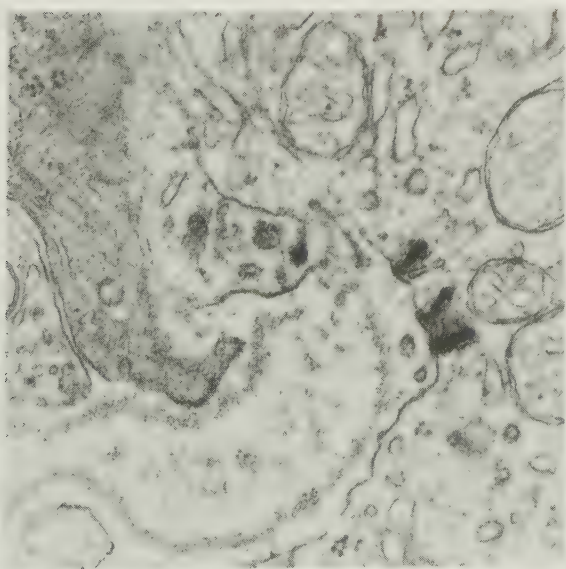


Abbildung 11
"Synaptic ribbons",
senkrecht und schräg
der Zellmembran aufsitzend.
Vergr. 40.000

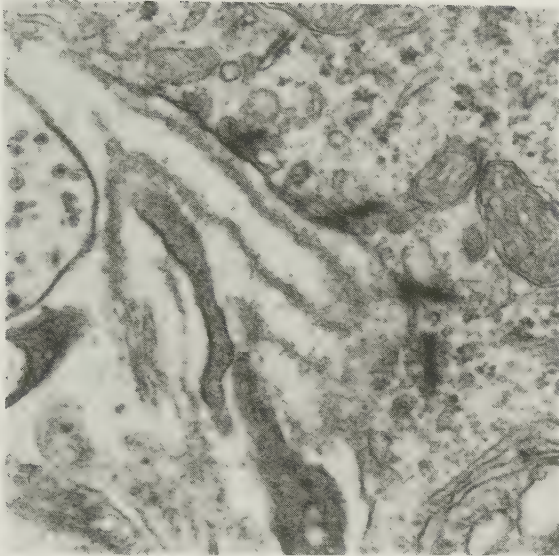


Abbildung 12

"Synaptic ribbons",
schräg der Zellmembran
aufsitzend und parallel
zur Membran liegend.

Vergr. 40.000

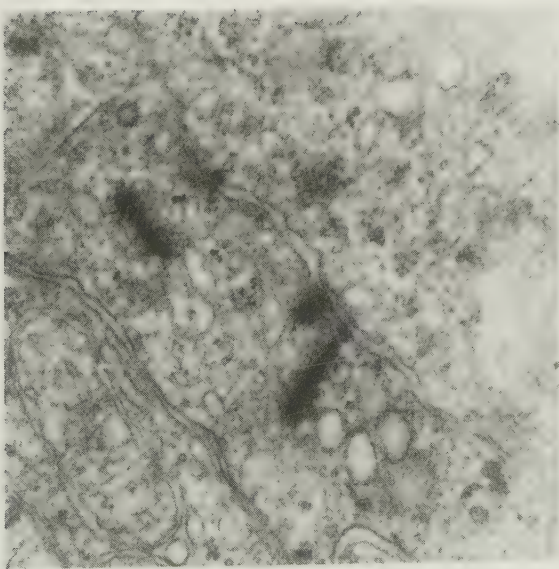


Abbildung 13

"Synaptic ribbons",
senkrecht und parallel
zur Zellmembran.

Vergr. 40.000

Tabelle 5

Beziehungen der "synaptic ribbons" zur Zellmembran und zum Zellkern. Angaben in Prozent (Anzahl).

	Membranberührung	Membrannähe	Kernnähe
Kon- trollen	43,1 (25)  58,6 (15)  41,4 (10)	53,5 (31)  50,8 (10)  25,6 (8)  23,1 (7)  20,5 (6)	3,4 (2)
Schein- stimu- lation	57,0 (53)  61,2 (32)  38,8 (21)	40,9 (38)  19,6 (8)  17,4 (7)  52,2 (19)  10,8 (4)	2,1 (2)
Stimu- lation	48,9 (44)  69,2 (30)  30,8 (14)	47,7 (43)  28,8 (13)  40,4 (17)  9,6 (4)	3,4 (3)

-  senkrecht zur Zellmembran mit Berührung
-  schräg zur Zellmembran mit Berührung
-  senkrecht zur Zellmembran ohne Berührung
-  schräg zur Zellmembran ohne Berührung
-  parallel zur Zellmembran
-  quer angeschnittene "synaptic ribbons"

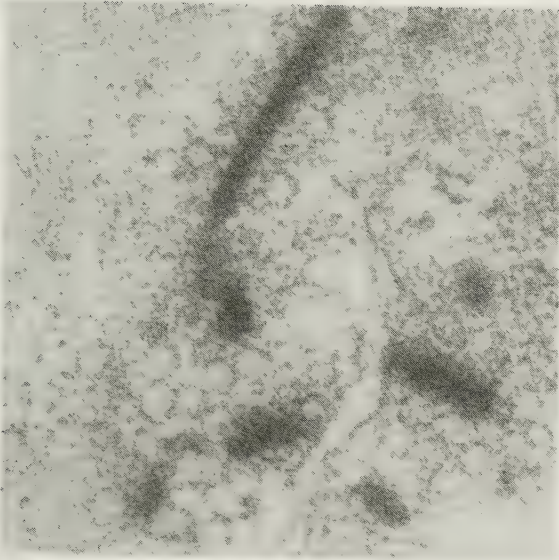


Abbildung 14

"Paired ribbon field",
scheinstimuliertes Tier.

Vergr. 65.000

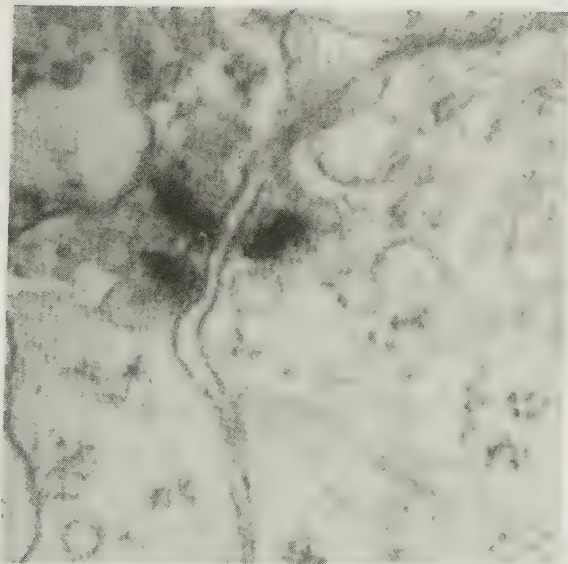


Abbildung 15

"Paired ribbon field",
stimuliertes Tier.

Vergr. 65.000

3.3. Korrelation von Serotonin-N-Acetyltransferase- und Hydroxyindol-O-Methyltransferase-Aktivität und Anzahl der "synaptic ribbons".

Eine Korrelation zwischen NAT- und HIOMT-Aktivität und der Anzahl der "synaptic ribbons" und "ribbon fields" konnte weder mit dem Spearman-Rang ($p > 0,05$) noch mit dem linearen Korrelationskoeffizienten ($p > 0,05$) aufgezeigt werden.

4. Diskussion

4.1. Enzymaktivitäten

4.1.1. Serotonin-N-Acetyltransferase

Es wurde beobachtet, daß die NAT-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen mit der Synthese von Melatonin korreliert, was für eine Kontrolle dieses Enzyms über den circadianen Rhythmus der Melatoninsynthese spricht (Wilkinson et al. 1977, Illnerova et al. 1979). Die NAT-Aktivität folgt bei Ratten einem circadianen Rhythmus mit niedrigen Werten am Tag und 50-100 mal höheren Nachtwerten (Klein und Weller 1970, Rudeen et al. 1975, Deguchi 1975).

Für eine sympathische Regulation der Melatoninbildung sprechen folgende Befunde. Volkman und Heller (1971) beschrieben eine Verdoppelung der NAT-Aktivität nach unilateraler präganglionärer elektrischer Stimulation. Die Versuche wurden am Tag durchgeführt, wobei die Ratten zwei Stunden lang der elektrischen Reizung ausgesetzt waren. Bilaterale zweistündige Stimulation während der Nacht, nachdem die Enzymaktivität um 95 % durch 15 Minuten Lichteinwirkung reduziert worden war (Klein und Weller 1972), ergab einen 50-fachen Anstieg der NAT-Aktivität (Bowers und Zigmond 1980). Am Tage zeigte sich unter sonst gleichen Bedingungen ein nur etwa zwölfacher Anstieg der NAT-Aktivität (Bowers und Zigmond 1982). Eine unilaterale Stimulation (Bowers und Zigmond 1982) führte zu einem Anstieg der NAT-Aktivität, der geringer als die Hälfte des durch bilaterale Stimulation ausgelöst war.

Der Einfluß der sympathischen Innervation auf die Zirbeldrüse zeigte sich ebenso, wenn die postganglionären sympathischen

Nervenfasern durchschnitten oder durch Quetschung oder Kälte geschädigt wurden. Die nächtliche NAT-Aktivität wurde dadurch nach 2 Tagen um bis zu 90 % gesenkt und der tägliche Rhythmus aufgehoben (Zigmond et al. 1981, Bowers et al. 1984 a). Auch bilaterale Ganglionektomie hemmte den nächtlichen Anstieg der NAT-Aktivität (Klein et al. 1971).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren, zeigten die Befunde dieser Arbeit einen etwa dreifachen Anstieg der NAT-Aktivität nach einer zweistündigen sympathischen Stimulation am Tage.

Elektrophysiologische Untersuchungen mit intrapinealen Einzelzellableitungen an Ratten (Reuss und Vollrath 1984) und Meerschweinchen (Semm und Vollrath 1980) zeigten, daß es Pinealozyten gibt, die eine deutliche Zunahme der Spontanaktivität zur Nachtzeit aufweisen; die Vermutung liegt nahe, daß hier ein Zusammenhang mit der nachts gesteigerten Melatoninsekretion bestehen könnte. Nach Stimulation des Ganglion cervicale superius wurde unter anderem eine transiente Entladungsrate einzelner spontan aktiver Pinealozyten evoziert (Schapiro und Salas 1971, Reuss et al. 1985). Im Hinblick darauf, daß die NAT-Aktivität nach elektrischer Stimulation steigt (Volkman und Heller 1971, Bowers und Zigmond 1980, 1982) könnte man annehmen, daß Pinealozyten, die auf Stimulation mit einer erhöhten elektrischen Entladungsrate antworten (Schapiro und Salas 1971, Reuss et al. 1985), in die Melatoninbildung involviert sind, wie es schon früher vermutet wurde (Schapiro und Salas 1971, Semm und Vollrath 1980, Semm et al. 1981 a, Reuss und Vollrath 1984, Reuss et al. 1985).

Dabei bliebe zu prüfen, ob Pinealozyten, die nachts eine erhöhte Spontanaktivität zeigen, und solche, die auf elektrische Reizung mit einer erhöhten Entladungsrate reagieren, zur selben Zellpopulation gehören.

Zu berücksichtigen sind aber auch zentrale Einflüsse auf die NAT-Aktivität. Direkte Verbindungen der Nuclei paraventriculares zur Zirbeldrüse wurden bei Meerschweinchen (Korf und Wagner 1980)

und Ratten (Buijs und Pévet 1980, Guérillot et al. 1982, Reuss und Møller 1986) nachgewiesen. Durch Stimulation der Nuclei paraventriculares konnte die elektrische Aktivität einzelner Pinealocyten beeinflusst werden (Reuss et al. 1984).

Außerdem zeigte sich nach Stimulation der Nuclei paraventriculares eine signifikante Verminderung der nächtlichen NAT-Aktivität (Reuss et al. 1985); weiterhin wird der Rhythmus der pinealen Melatoninsynthese durch bilaterale Schädigung der Nuclei paraventriculares gestört (Klein et al. 1983). Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muß aber beachtet werden, daß die Nuclei paraventriculares auch in die multisynaptische periphere sympathische Verbindung von der Retina zum Corpus pineale eingeschaltet sind, die, wie die vorangestellten Befunde deutlich machen, den wahrscheinlich stärksten Einfluß auf die Aktivität der NAT hat.

4.1.2. Hydroxyindol-O-Methyltransferase

Bei Kaninchen (Gallardo und Tramezzani 1974) und Ratten (Axelrod et al. 1965) wurde ein täglicher Rhythmus der HIOMT-Aktivität beschrieben, mit höheren Werten in der Nacht und niedrigeren am Tage. Andere Arbeitsgruppen konnten dagegen bei Ratten keinen täglichen Rhythmus der HIOMT-Aktivität nachweisen (Quay 1967, Merrit und Sulkowsky 1969). Nach Ganglionektomie bei Ratten (Wurtman et al. 1964, Moore und Rapport 1971, Nagle et al. 1983), Hamstern (Eichler und Moore 1971) und Kaninchen (Gallardo und Tramezzani 1974) verringerte sich die HIOMT-Aktivität deutlich.

Eine 18-prozentige Reduzierung der HIOMT-Aktivität an gebundenen Ratten wurde nach präganglionärer Stimulation beobachtet (Brownstein und Heller 1968).

In der vorliegenden Untersuchung wurde nach präganglionärer Stimulation keine Wirkung auf die HIOMT-Aktivität gefunden. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede der Werte von Stimulierten, Scheinstimulierten und Kontrolltieren. Obwohl es Hinweise auf adrenerge Einflüsse auf die pineale HIOMT gibt (Sudgen und Klein 1983 a, b, c), lassen doch das Fehlen des Tag-/Nachttrhythmus der HIOMT-Aktivität bei Ratten (Quay 1967, Merrit und Sulkowsky 1969) und die hier gezeigte Wirkungslosigkeit der elektrischen Reizung am Ganglion cervicale superius vermuten, daß die sympathische Innervation zunächst keinen direkten Einfluß auf die Aktivität der HIOMT hat. Es mag vermutet werden, daß auch methodische Unterschiede zwischen einzelnen Arbeiten (z.B. Blendung der Versuchstiere: Brownstein und Heller 1968; oder auch verschiedene Reizparameter) die Ursachen für die erwähnten Diskrepanzen bezüglich der Wirkung sympathischer Stimulation auf die HIOMT-Aktivität sind.

4.2. "Synaptic ribbons", "synaptic spherules"

Obgleich die funktionelle Bedeutung der "synaptic ribbons" in der Säugetierrepiphyse noch nicht geklärt ist, haben die unterschiedlichen Reaktionen unter natürlichen und experimentellen Bedingungen zu den verschiedensten Hypothesen geführt:

- "Synaptic ribbons" könnten der interzellulären Kommunikation dienen, indem sie die Reize der sympathischen Nervenfasern weiterleiten (Vollrath und Huss 1973, Vollrath 1973),
- sie könnten mit dem Transport und der Abgabe pinealer Sekrete zu tun haben (King und Dougherty 1980),
- des weiteren wurde die Kontrolle der "synaptic ribbons" über die Anzahl der β -adrenergen Rezeptoren der Zellmembran (King und Dougherty 1982 a, b) und

-eine Verbindung zwischen Ribbonformation und Melatoninbildung diskutiert (Martinez Soriano et al. 1984).

4.2.1. Morphologie

Bei den untersuchten Ratten wurden nur 2 von insgesamt 242 synaptischen Strukturen als "synaptic spherules" identifiziert. Das ist vergleichbar mit früheren Untersuchungen an Ratten (Karasek und Vollrath 1982, Vollrath und Welker 1984), in denen die "synaptic spherules" nur einen kleinen Teil ausmachten.

Außer den stäbchen- und ballförmigen Strukturen wurden beim Kaninchen auch dreieckige, viereckige, nierenförmige und ovale Strukturen gefunden (Martinez Soriano et al. 1984). Beim Hamster wurden auch keulenförmige und ringförmige Organellen beschrieben (Hewing 1980, Matsushima et al. 1983). In dieser Untersuchung konnten 9 gebogene Stäbchen und 4 quadratische Strukturen beobachtet werden. Ob diesen morphologischen Unterschieden auch funktionelle Bedeutung zukommt, ist nicht bekannt.

Im Vergleich zu Meerschweinchen, bei denen die Länge der "ribbons" 410-560 nm mißt (Vollrath 1986), wurden bei Ratten im allgemeinen kleinere "synaptic ribbons" beobachtet (218-251 nm). Das zeigte auch die Arbeit von Maitra et al. (1986: 199-206 nm). Ein Einfluß der sympathischen Innervation auf die Länge der Stäbchen konnte durch die Stimulation an den oberen Halsganglien nicht nachgewiesen werden. Die Werte zeigten keine statistisch signifikanten Abweichungen.

4.2.2. Intrazelluläre Verteilung

Martinez Soriano et al. (1984) fanden 95,8 % der synaptischen Strukturen im Fortsatz von Pinealozyten, während in dieser Arbeit bei den stimulierten Tieren 73 %, bei den Scheinstimulierten 70 % und bei den Kontrolltieren 74 % der "synaptic ribbons" im Fortsatz gefunden wurden. Ungefähr 95 % der "synaptic ribbons" lagen dabei in der Nähe der Zellmembran.

Die meisten der "synaptic ribbons" mit Membranberührung standen dieser senkrecht auf (Kontrollen 58,6 %, Scheinstimulation 61,2 %, Stimulation 69,2 %). Die hellen Vakuolen, von denen die "synaptic ribbons" normalerweise umgeben sind, wurden bei "ribbons", die parallel zur Membran lagen, nicht in jedem Fall beobachtet. Von den "synaptic ribbons", welche die Membran nicht berührten, waren bei den Kontrollen die senkrecht zur Membran gelegenen (50,8 %), bei den scheinstimulierten Tieren die parallel zur Membran gelegenen (52,2%) und bei den stimulierten Ratten die schräg zur Membran gelegenen (40,4 %) am häufigsten vertreten. In der Untersuchung von Martinez Soriano et al. (1984) standen 68,5 % der synaptischen Strukturen senkrecht zur Membran, während der Rest (31,5 %) parallel dazu lag.

Nach Dauerbeleuchtung erhöhte sich die Anzahl der "paired ribbon fields" um das 10-fache (Vollrath 1986). Im Gegensatz dazu hat bilaterale Stimulation offensichtlich keinen Einfluß auf deren Anzahl. Bei den drei hier untersuchten Gruppen wurde je ein "paired ribbon field" pro Gruppe gefunden.

Martinez Soriano et al. (1984) beschreibt bei Kaninchen eine sichtbare Zunahme der "ribbon fields" während der Nacht, wogegen am Tage einzeln vorkommende synaptische Strukturen überwiegen. In der vorliegenden Arbeit wurden "synaptic ribbons" einzeln oder in Gruppen bis zu 7 Stück zusammen gefunden. Die einzeln liegenden "synaptic ribbons" waren jedoch bei allen drei Gruppen vorherrschend (Kontrollen 78,9 %, Scheinstimulation 76,8 %, Stimulation 76,8 %).

Stimulation 73,1 %), so daß die Stimulation auch keinen Einfluß auf die Bildung größerer "ribbon fields" erkennen läßt.

4.2.3. Topographische Beziehungen

Diese Untersuchung zeigte, daß sympathische Stimulation keine signifikanten Unterschiede in der Lageverteilung von "synaptic ribbons" hervorrief. Offen bleibt, ob dies auf einer prinzipiellen Inertheit dieser Strukturen gegenüber der sympathischen Innervation beruht oder ob sympathische Fasern Pinealozyten mit "synaptic ribbons" nicht erreichen und somit nicht beeinflussen können. 82 % der "synaptic ribbons" lagen benachbart von anderen Pinealozyten, 9,7 % gegenüber von Blutgefäßen und nur 5,5 % der "synaptic ribbons" befanden sich in der Nähe von Nervenfasern.

Frühere Untersuchungen am Meerschweinchen (Vollrath 1973) ergaben, daß 93,1 % der "synaptic ribbons" anderen Pinealozyten, 5,4 % Blutgefäßen, 1,3 % Nervenfasern und 0,3 % Kollagenfasern benachbart lagen. Karasek (1983) fand ein umgekehrtes Verhältnis von "synaptic ribbons" und sympathischen Nervenendigungen in den Zirbeln von verschiedenen Säugetieren. Es zeigte sich, daß nur sehr wenige der Pinealozyten, die "synaptic ribbons" enthalten, in der Nähe von Nervenendigungen zu finden sind, was dafür sprechen könnte, daß diese Strukturen nicht direkt nerval zu beeinflussen sind.

4.2.4. Reaktionen unter physiologischen und experimentellen Bedingungen

Unter "LD 12:12" Lichtverhältnissen zeigen "synaptic ribbons" und "synaptic spherules" einen typischen Tag-/Nachtrhythmus mit Spitzenwerten in der Nacht und niedrigen Werten am Tag (Vollrath 1973, Kurumado und Mori 1977, Theron et al. 1979, King und Dougherty 1980, Mc Nulty 1981). Beim Meerschweinchen weisen "synaptic spherules" einen gegenläufigen Tag-/Nachtrhythmus auf (Vollrath et al. 1983). Eine 24-Stunden-Studie ergab einen signifikanten Unterschied der Tag-/Nachtwerte nur für die "synaptic ribbons", nicht aber für die "synaptic spherules" (Martinez Soriano et al. 1984).

Nach vierundsechzigitägigem Aufenthalt von Meerschweinchen in ständiger Helligkeit (LL) zeigten männliche Tiere eine zwanzigfache, die Weibchen eine neunfache Zunahme dieser Strukturen (Vollrath 1973). Auch Lues (1971) stellte eine zahlenmäßige Zunahme der "synaptic ribbons" unter Dauerbeleuchtung (70 Tage) fest. Nach Aufenthalt in ständiger Dunkelheit (26-70 Tage) gab es uneinheitliche Resultate. Einige Meerschweinchen zeigten eine Vermehrung der "synaptic ribbons", bei anderen gab es keine Reaktionen. Nach 4 Monaten Dauerbeleuchtung vermehrten sich bei männlichen Meerschweinchen die "synaptic ribbons", während die "synaptic spherules" abnahmen (Vollrath 1986). Die Zunahme der "synaptic ribbons" betrug aber weniger als in der Studie von Vollrath und Huss 1973 (LL 64 Tage). Die Gründe für dieses Verhalten sind nicht bekannt. Schon ein kurz andauernder Lichteinfluß während der Nacht genügt, um die Anzahl der "synaptic ribbons" auf annähernde Tageswerte zu vermindern (Maitra et al. 1986).

In Organkulturen von ausgewachsenen Tieren fehlte der typische Tag-/Nachtrhythmus: Die "synaptic spherules" vermehrten sich, während die Anzahl der "synaptic ribbons" relativ konstant blieb

(Karasek und Vollrath 1982). Arstila et al. (1971) fanden weder "synaptic ribbons" noch "synaptic spherules" in vitro nach 4-8 Tagen. Es kann möglich sein, daß diese Strukturen nach längeren Perioden in den Zellkulturen weniger werden und schließlich ganz verschwinden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Experimente mit verschiedenen Tierarten machen die Erklärung des Mechanismus, der dafür verantwortlich ist, schwierig.

4.2.5. Einfluß von Denervation und Stimulation am Ganglion cervicale superius.

Sympathische Denervation bewirkte beim Kaninchen zuerst eine Zunahme der "synaptic spherules", gefolgt von einem Anstieg der "synaptic ribbons" (Romijn 1975). King und Dougherty (1982 a) beobachteten bei Ratten dagegen zwölf bis vierundzwanzig Stunden nach bilateraler Ganglionektomie eine deutliche Abnahme der "synaptic ribbons", gefolgt von einer Zunahme der "synaptic ribbons" gegenüber den Kontrolltieren nach 14 Tagen.

Die Befunde von Gonzales und Alvarez-Uria (1986), die durch fünfzehnminütige bilaterale Reizung am Ganglion cervicale superius mit 25 Hz und 1 ms Impulsdauer einen mehr als fünffachen Anstieg der "synaptic ribbons" bei Katzen erreichten, sprachen für einen Einfluß der sympathischen Innervation auf die Bildung von "synaptic ribbons". In der vorliegenden Untersuchung konnten keine signifikanten Änderungen der Ribbonzahl bei stimulierten Tieren, im Vergleich zu Kontrolltieren, festgestellt werden. Das läßt darauf schließen, daß bei Ratten die sympathische Innervation keinen Einfluß auf die Formation der "synaptic ribbons" hat. Der Vergleich zu Katzen läßt vermuten, daß dabei speziesbedingten Unterschieden eine entscheidende Rolle zukommen könnte.

Alternativ muß natürlich mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß die gewählten Reizparameter für eine Beeinflussung der "ribbons" nicht optimal sind. Obwohl sich in früheren Untersuchungen (Volkman und Heller 1971, Bowers und Zigmond 1980, 1982) und in der hier vorgestellten Arbeit die Stimulation als für die NAT-Aktivierung hinreichend gezeigt hat, handelt es sich doch um mehr oder weniger unphysiologische Reize, deren Wirkung zwar im Gesamtorgan (siehe NAT) sichtbar sein könnte, sich aber nicht zwangsläufig auf dem Einzelzellniveau nachweisen lassen muß.

Elektrophysiologische Untersuchungen an Ratten haben ergeben, daß es in der Zirbeldrüse spontan aktive Zellen gibt, die nicht unter der Kontrolle der sympathischen Innervation zu stehen scheinen, d.h. sie reagieren nicht auf Reizungen des Ganglion cervicale superius (Reuss et al. 1985). Da auch "synaptic ribbons" im Rattenpineal nicht auf sympathische Reize anzusprechen scheinen, wäre es denkbar, daß sie in solchen sympathisch nicht zu beeinflussenden Pinealozyten liegen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß diese Zellen von zentralen Nervenfasern innerviert werden, die einen weiteren neuronalen Input der Zirbel darstellen (Ronnekleiv et al. 1980, Semm et al. 1981 b, Reuss et al. 1984). Beim Meerschweinchen wird angenommen, daß etwa die Hälfte der Pinealozyten unter zentraler Kontrolle steht (Semm und Vollrath 1982). Schapiro und Salas (1971) zeigten, daß Ganglionektomie bei Ratten nicht die Wirkung von Lichtstimulationen auf die elektrische Aktivität der Zirbeldrüse verhindern konnte. Sie nahmen an, daß die Lichtsignale die Zirbel über die Commissura posterior erreichten. Die durch Lichteinwirkung hervorgerufenen Potentialänderungen in der Zirbeldrüse konnten aber unterdrückt werden durch Durchtrennung des Zirbeldrüsenstiels (Pazo 1981).

Dies könnte bedeuten, daß eine zentrale pinealopetale Verbindung für die bisher beschriebenen Reaktionen der "synaptic ribbons" auf äußere Lichteinflüsse verantwortlich sein könnte. Weiterführende Tierexperimente, vor allem im Hinblick auf eine

zentrale Beeinflussung der "synaptic ribbons", müßten zur Klärung dieser Hypothesen geplant werden, wobei die periphere Verbindung ganz ausgeschaltet werden müßte.

4.2.6. Korrelation von "synaptic ribbons" und Melatoninbildung

In der Arbeit von Martinez Soriano et al. (1984) wird eine enge Korrelation ($R=0,8$) zwischen Melatoninbildung und der Zunahme der "synaptic ribbons" beim Meerschweinchen beschrieben, wobei die Spitzenwerte der "synaptic ribbons" denen der Melatoninbildung um 4 Stunden vorausseilen. Bei der Ratte ergab sich keine Korrelation zwischen der Anzahl der "synaptic ribbons" und der NAT-Aktivität, dem Melatoninspiegel in der Zirbel und dem Melatoninspiegel im Serum; weder bei Tag noch bei Nacht (Vollrath und Welker 1984).

Auch in dieser Arbeit konnten keine Anhaltspunkte für eine Korrelation zwischen NAT-Aktivität und der Anzahl der "synaptic ribbons" gefunden werden. Melatoninsynthese und "synaptic ribbons" weisen gleichartige Tag-/Nachtrhythmen auf. Die gefundenen Ergebnisse zeigen aber, daß die Rhythmizität der Bildung der "synaptic ribbons" offensichtlich nicht in die Enzyymbildung involviert ist.

5. Zusammenfassung

Zur Bestimmung der NAT- und HIOMT-Aktivität sowie zur Quantifizierung der "synaptic ribbons" nach elektrischer Stimulation des Ganglion cervicale superius wurden betäubten, adulten, männlichen Sprague-Dawley Ratten nach Dekapitation die Zirbeldrüsen entnommen und biochemisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

Es zeigte sich, daß die elektrische Stimulation einen steigernden Einfluß auf die NAT-Aktivität hatte. Dagegen konnte keine Wirkung auf die HIOMT-Aktivität und auf die "synaptic ribbons" beobachtet werden. Die "synaptic ribbons" veränderten sich weder in der Zahl noch in der Größe, auch konnten keine signifikanten Veränderungen in ihrer Lage nachgewiesen werden.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die "synaptic ribbons" der Rattenzirbeldrüse, im Gegensatz zu denen der Katze, (unter den gegebenen Versuchsbedingungen) offenbar nicht direkt vom Sympathikus beeinflußt werden.

Offensichtlich bestehen bei der Ratte keine direkten Beziehungen zwischen der Anzahl der "synaptic ribbons" und der NAT- und HIOMT-Aktivität der Zirbeldrüse.

Dies legt den Gedanken nahe, daß, obwohl "synaptic ribbon"-Zahlen und NAT-Aktivität circadian gleichsinnig schwanken, sie auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Für die Regulation der "synaptic ribbons" verdient die nicht-sympathische Innervation der Zirbeldrüse besondere Beachtung.

6. Literatur

- Anton-Tay F (1971) Pineal-brain relationships. In: Wolstenholme G.E.W. and Knight J (eds): The pineal gland. A Ciba Foundation-symposium, Edinburgh and London: Churchill Livingstone, pp 213-227
- Anton-Tay F, Chou C, Anton S, Wurtman RJ (1968) Brain serotonin concentration: Elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science* 162: 277-278
- Anton-Tay F, Wurtman RJ (1969) Regional uptake of H^3 -melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature (Lond.)* 221: 474-475
- Arendt J, Symons AM, Land CA, Pryde SJ (1983) Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *J Endocr* 97: 395-400
- Arendt J, Wirk-Justice A, Bradtke J (1978) Annual rhythm of serum melatonin in man. *Neurosci Lett* 7: 327-330
- Arendt J, Hampton S, English J, Kawasowski P, Marks V (1982) 24-hour profiles of melatonin, cortisol, insulin, C-peptide and GJP following a meal and subsequent fasting. *Clin Endocr* 16:89
- Arstila AU, Kalimo HO, Hyyppä M (1971) Secretory organelles of the rat pineal gland: Electron microscopic and histochemical studies in vivo and in vitro. In: Wolstenholme G.E.W. and Knight J (eds): The pineal gland. Edinburgh and London: Churchill Livingstone, pp 147-195
- Axelrod J (1974) The pineal gland: A neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-1348
- Axelrod J, Weissbach H (1961) Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem* 236: 211-213
- Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH (1965) Control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J Biol Chem* 240: 949-954

- Barber SG, Smith JA, Hughes RC (1978) Melatonin as a tumor marker in a patient with a pineal tumor. *Brit med J* 2:328
- Berk ML, Finkelstein JA (1981) An autoradiographic determination of the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 226: 1-13
- Boekmann D (1980) Morphological investigations of the deep pineal of the rat. *Cell Tiss Res* 210: 283-294
- Bowers CW, Baldwin C, Zigmond RE (1984 a) Sympathetic reinnervation of the pineal gland after postganglionic nerve lesion does not restore normal pineal function. *Neurosci* 4: 2010-2015
- Bowers CW, Dahm LM, Zigmond RE (1984 b) The number and distribution of sympathetic neurons that innervate the rat pineal gland. *Neurosci* 13: 87-96
- Bowers CW, Zigmond RE (1982) The influence of the frequency and pattern of sympathetic nerve activity on serotonin-N-acetyltransferase in the rat pineal gland. *J Physiol* 330: 279-296
- Bowers CW, Zigmond RE (1980) Electrical stimulation of the cervical sympathetic trunks mimics the effects of darkness on the activity of serotonin-N-acetyltransferase in the rat pineal. *Brain Res* 185: 435-440
- Brownstein MJ, Heller A (1968) Hydroxyindole-O-methyltransferase activity: Effect of sympathetic nerve stimulation. *Science* 162: 367-368
- Buijs RM, Pévet P (1980) Vasopressin and oxytocin containing fibers in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. *Cell Tiss Res* 205: 11-17
- Cardinali DP (1974) Melatonin and the endocrine role of the pineal organ. In: *Current topics in experimental endocrinology* (V.H.T. James and L. Martini eds.), Academic Press 1974, New York 2: 107-127

- Cardinali DP, Freire F (1975) Melatonin effects on brain: Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmatic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Molecular Cell Endocr* 2: 317-330
- Cardinali DP, Hyyppä MT, Wurtman RJ (1973) Fate of intracisternally injected melatonin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 12: 30-40
- Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM (1974) Metabolic fate of androgens in the pineal organ: uptake, binding to cytoplasmic proteins and conversion of testosterone into 5 alpha-reduced metabolites. *Endocrinology* 95: 179-187
- Collin JP, Oksche A (1981) Structural and functional relationships in the nonmammalian pineal organ. In: *The pineal gland- Vol I* Reiter RJ ed. CRC Press Boca Raton, Florida pp 27-68
- De Graaf HW (1886) *Zool Anz* 9: 191
- Deguchi T (1975) Ontogenesis of a biological clock for serotonin acetyl coenzym N-acetyltransferase in pineal gland of rat *Proc nat Acad Sci (Wash)* 72: 2814-2818
- Deguchi T, Axelrod J (1972) Sensitive assay for serotonin-N-acetyltransferase activity in rat pineal gland. *Analyt Biochem* 50: 174-179
- Dowling JE, Boycott BB (1966) Organisation of the primate retina: Electron microscopy. *Proc Soc B* 166: 80-111
- Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M (1986) Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231: 491-493
- Ehrenkranz JR, Tamarkin L, Comite E, Johnsonbaugh RE, Bybee DE, Loriaux DL, Cutter GB (1982) Daily rhythm of plasma melatonin in normal and precocious puberty. *J clin Endocr* 55: 307
- Eichler VB, Moore RY (1971) Pineal hydroxyindole-O-methyltransferase and gonadal responses to blinding or continuous darkness blocked by pineal denervation in the male hamster. *Neuroendocrinology* 8: 81-85

- Ferrier JN, Arendt J, Johnstone EC, Crow TJ (1982) Reduced nocturnal melatonin secretion in chronic schizophrenia. Relationship to body weight. *Endocr* 17:181
- Fujita T (1976) The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature. In: Conpland RE, Fujita T (Hrg), Chromaffin, enterochromaffin and related cells. Elsevier, Amsterdam pp 191-208
- Gallardo MR, Tramezzani JH (1974) Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the pineal gland of the rabbit. *J neural transm* 36: 51-57
- Goldman B, Hall V, Hollister C, Reppert S, Roychondhury P, Yellon S, Tamarkin L (1981) Diurnal changes in pineal melatonin content in four rodent species: Relationship to photoperiodism. *Biol Reprod* 24: 778-783
- Goldman B, Hall V, Hollister C, Roychondhury P, Tamarkin L, Westrom W (1982) Effects of melatonin on the reproductive system in intact and pinealectomized male hamsters maintained under various photoperiods. *Endocrinology* 104: 82
- González G, Alvarez-Uria M (1986) Morphometric analysis of the synaptic ribbons and nerv vesicles of the cat pineal gland after electrical stimulation of the superior cervical ganglia. *J Pineal Res* 3: 15-23
- Groos GA, Meijer JH (1985) Effects of illumination on supra-chiasmatic nucleus electrical discharge. In: *Anual of the New York Academy of sciences* Vol. 455: 123-133 The medical and biological effects of light.
- Guérillot C, Pfister A, Müller J, Dalage C (1982) Recherche de l'orgine des fibres nerveuses extraorthosympathiques innervant l'éphiphyse du rat (étude du transport retrograd de la peroxydase de raifort) *Reprod Nutr Dev* 22: 371-378
- Gwinner E (1978) Effects of pinealectomy on circadian locomotor activity rhythms in European starlings, *Sturmus vulgaris* *J Comp Physiol* 126: 123-129

- Hartwig HG, Oksche A (1981) Photoneuroendocrine cells and systems: A concept revisited. In: Oksche, A, Pevet, P, (Hrg.) The pineal organ: Photobiology-Biochronometry-Endocrinology Biomedical Press, Elsevier 49-59
- Heldmaier G, Böckler H, Buchberger A, Lynch G, Puchalsky W, Steinlechner S, Wiesinger H (1985) Seasonal acclimation and thermogenesis, circulation, respiration and metabolism. (ed by R Gilles) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Hewing M (1980) Synaptic ribbons in the pineal system of normal and light deprived golden hamsters. Anat Embryol 159: 71-80
- Iguchi H, Kato KI, Ibayashi H (1982) Age-dependent reduction in serum melatonin concentration in healthy human subjects. J clin Endocr 55: 27
- Illnerová H, Baekström M, Sääf J, Wetterberg L, Vangbo B (1978) Melatonin in rat pineal gland and serum: Rapid parallel decline after light exposure at night. Neurosci Lett 9: 189-193
- Illnerova H, Vanecek J, Krecek J, Wetterberg L, Saaf J (1979) Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin-N-acetyltransferase and melatonin. J Neurochem 32: 673-675
- Kappers JA (1960) The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. Zschr Zellforsch Mikrosk Anat 52: 163-215
- Karasek M (1983) Ultrastructure of the mammalian pineal gland: Its comparative and functional aspects. In: Reiter RJ (ed) Pineal research reviews Vol. 1 Alan R. Liss., Inc., New York pp 1-48
- Karasek M, King TS, Richardson BA, Hurlbut EC, Hansen JT, Reiter RJ (1982) Day night differences in the number of pineal synaptic ribbons in two diurnal rodents, the chipmunk (*Tamias striatus*) and the ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*). Cell Tiss Res 224: 689-692

- Karasek M, Vollrath L (1982) Synaptic ribbons and spherules of the rat pineal gland: Day-night changes in vitro? *Exp Brain Res* 46: 205-208
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137 A-138 A
- King TS, Dougherty WJ (1980) Neonatal development of circadian rhythm in synaptic ribbon numbers in the rat pinealocyte. *Am J Anat* 157: 335-343
- King TS, Dougherty WJ (1982 a) Effect of denervation on synaptic ribbon populations in the rat pineal gland. *J Neurocytol* 11: 19-28
- King TS, Dougherty WJ (1982 b) Age-related changes in pineal synaptic ribbon populations in rats exposed to continuous light or darkness. *Am J Anat* 163: 169-179
- Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. Photoperiodism, melatonin and the pineal. Pitman, London, Ciba Foundation Symposium 117: 38-56
- Klein DC, Buda M, Kapoor C, Krishna G (1978) Pineal serotonin-N-acetyltransferase activity: Abrupt decrease in adenosine 3', 5'-monophosphate may be signal for "turn off". *Science (Wash DC)* 199: 309-311
- Klein DC, Smoot R, Weller JL, Higa S, Markey SP, Creed GJ, Jacobowitz DM (1983) Lesions in the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic-spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Res Bull* 10: 647-652
- Klein DC, Weller JL (1970) Indole metabolism in the rat pineal gland: A circadian rhythm in N-acetyltransferase activity. *Science NY* 169: 1093-1095
- Klein DC, Weller JL (1972) Rapid light-induced decrease in pineal serotonin-N-acetyltransferase activity. *Science NY* 177: 532-533

- Klein DC, Weller JL (1973) Adrenergic-adenosine 3', 5'-mono-phosphat regulation of serotonin-N-acetyltransferase activity and the temporal relationship of serotonin-N-acetyltransferase activity to synthesis of ^3H -N-acetylserotonin and ^3H -melatonin in the cultured rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 186:516-527
- Klein DC, Weller JL, Moore RY (1971) Melatonin metabolism: Neural regulation of pineal serotonin: Acetylcoenzym A N-acetyltransferase activity. *Proc Nat Acad Sci USA* 68: 3107-3110
- Korf HW, Møller M (1984) The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. In: Reiter RJ (ed) *Pineal research reviews Vol. 2* Alan R. Liss., Inc., New York pp 41-86
- Korf HW, Wagner U (1980) Evidence for a nervous connection between the brain and the pineal organ in the guinea-pig. *Cell Tiss Res* 209: 505-510
- Kosaras B, Welker HA, Vollrath L (1983 a) Pineal synaptic ribbons and spherules during the estrous cycle in rats. *Anat Embryol* 166: 219-227
- Kosaras B, Welker HA, Mess B, Vollrath L (1983 b) Depressive effect of LHRH on the numbers of synaptic ribbons and spherules in the pineal gland of diestrous rats. *Cell Tiss Res* 229: 461-466
- Kurumadu K, Mori W (1977) A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. *Cell Tiss Res* 182: 565-568
- Lerner AB, Case JD (1960) Melatonin *Fed Proc* 19: 590-593
- Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV (1959) Structure of melatonin. *J Amer Chem Soc* 81: 6084-6085
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

- Lues G (1971) Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trächtiger und experimentell beeinflusster Meerschweinchen. Z Zellforsch 114: 38-60
- Maitra SK, Huesgen A, Vollrath L (1986) The effects of short pulses of light at night on numbers of pineal synaptic ribbons and serotonin-N-acetyltransferase activity in male Sprague-Dawley rats. Cell Tiss Res 246: 133-136
- Martinez Soriano F, Welker HA, Vollrath L (1984) Correlation of the number of pineal synaptic ribbons and spherules with the level of serum melatonin over a 24-hour period in male rabbits. Cell Tiss Res 236: 555-560
- Matsushima S, Morisawa Y, Aida I, Abe K (1983) Circadian variations in pinealocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). A quantitative electron microscopic study. Cell Tiss Res 228: 231-244
- Mc Nulty JA (1981) Synaptic ribbons in the pineal organ of the goldfish: Circadian rhythmicity and the effects of constant light and constant darkness. Cell Tiss Res 215: 491-497
- Meinzel A (1981) New aspects of the phylogenetic evolution of sensory cell lines in the vertebrate pineal complex. In: The pineal organ. Photobiology-Biochronometry-Endocrinology Oksche A and Pévet P (eds) pp 27-49
- Menaker M, Zimmerman N (1976) Role of the pineal in the circadian system of birds. Amer Zool 16: 45-55
- Merritt JH, Sulkowski TS (1969) Alterations of pineal gland biorhythmicity N-methyl-3-piperidylbenzilate. J Pharmacol Exp Therap 166: 119-124
- Moore RY, Klein DC (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin-N-acetyltransferase activity. Brain Res 71: 17-33
- Moore RY, Rapport RL (1971) Pineal and gonadal function in the rat following cervical sympathectomy. Neuroendocrinology 7: 361-374

- Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA (1982) The clocks that time us: Physiology of the circadian timing system. Cambridge Mass.: Harvard University Press 169: 174-176,293
- Nagle CA, Cardinali DP, Rosner JM (1973) Retinal and pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in the rat: Changes following cervical sympathectomy, pinealectomy or blinding. Endocrinology 92: 1560-1564
- Oksche A, Hartwig HG (1979) Pineal sense organs-components of photoneuroendocrine systems. In: The pineal gland of vertebrates including man. Kappers A, Pévet P (Hrg) Biomedical press, Elsevier pp 113-130
- Oksche A, Pévet P (1981) The pineal organ. Photobiology-Biochronometry-Endocrinologie. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, pp 1-366
- Oksche A, Ueck M, Rüdeberg C (1971) Comparative ultra-structural studies of sensory and secretory elements in different pineal organs. Mem Soc Endocrinol 19: 7-25
- Pazo JH (1981) Electrophysiological study of evoked electrical activity in the pineal gland. J Neural Transm 52: 137-158
- Quay WB (1963) Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. Gen Comp Endocr 3: 473-479
- Quay WB (1964) Circadian and estrous rhythms in pineal and brain serotonin. Prog Brain Res 8: 61-63
- Quay WB (1967) Lack of day-night rhythm and effect of darkness in rat pineal content of N-acetylserotonin-O-methyltransferase. Physiologist 10: 286
- Quay WB (1974) Pineal chemistry. Chartes C. Thomas, Springfield Illinois
- Rando TA, Bowers CW, Zigmond RE (1981) Localization of neurons in the rat spinal cord which project to the superior cervical ganglion. J Comp Neurol 196: 73-83
- Reiter RJ (1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982) The pineal. Annual Res Rev Vol. 1 - Vol. 7 Eden Press, Montreal

- Reiter RJ (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1: 109-131
- Reiter RJ (1983) The pineal gland: An intermediary between the environment and the endocrine system. *Psychoneuroendocrinology* 8: 31-40
- Reiter RJ, Blask DE, Johnson LY, Rudeen PK, Vaughan MK, Waring PJ (1976) Melatonin inhibition of reproduction in the male hamster: Its dependency on time of day of administration and on intact and sympathetically innervated pineal gland. *Neuroendocrinology* 22: 107
- Reiter RJ (1976) The pineal. Vol I Annual Research Reviews, Eden Press Westmount
- Reuss S, Møller M (1986) Direct projections to the rat pineal gland via the stria medullaris thalami. *Cell Tiss Res* 244: 691-694
- Reuss S, Olcese J, Vollrath L (1985) Electrical stimulation of the hypothalamic paraventricular nuclei inhibits pineal melatonin synthesis in male rats. *Neuroendocrinology* 41: 192-196
- Reuss S, Semm P, Vollrath L (1984) Electrophysiological investigations of the central innervation of the rat and guinea-pig pineal gland. *J Neural Transm* 60: 31-34
- Reuss S, Semm P, Vollrath L (1985) Changes in the electrical activity of the rat pineal gland following stimulation of the cervical sympathetic ganglia. *J Anat Nerv Sys* 12: 281-288
- Reuss S, Vollrath L (1984) Electrophysiological properties of rat pinealocytes: Evidence for circadian and ultradian rhythms. *Exp Brain Res* 55: 455-461
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
- Rollag MD, Morgan RJ, Niswender GD (1978) Route of melatonin secretion in sheep. *Endocrinology* 102: 1-8

- Romijn HJ (1975) The ultrastructure of the rabbit pineal gland after sympathectomy, parasympathectomy, continuous illumination and continuous darkness. *J Neural Transm* 36: 183-194
- Ronnekleiv OK, Kelly MJ, Wuttke W (1980) Single unit recordings in the rat pineal gland: Evidence for habenulo-pineal neural connections. *Exp Brain Res* 39: 187-192
- Rudeen PK, Reiter RJ, Vaughan MK (1975) Pineal serotonin-N-acetyltransferase activity in four mammalian species. *Neurosci Lett* 1: 225-229
- Rusak B, Groos G (1982) Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* 215: 1408-1409
- Schapiro S, Salas M (1971) Effects of age, light and sympathetic innervation on electrical activity of the rat pineal gland. *Brain Res* 28: 47-55
- Semm P, Demaine C, Vollrath L (1981 a) Electrical responses of pineal cells to melatonin and putative transmitters: Evidence for circadian changes in sensitivity. *Exp Brain Res* 43: 361-370
- Semm P, Schneider T, Vollrath L (1981 b) Morphological and electrophysiological evidence for habenular influence on the guinea pig pineal gland. *J Neural Transm* 50: 247-266
- Semm P, Vollrath L (1980) Electrophysiological evidence for circadian rhythmicity in a mammalian pineal organ. *J Neural Transm* 47: 181-190
- Semm P, Vollrath L (1982) Alterations in the spontaneous activity of cells in guinea-pig pineal gland and visual system produced by pineal indoles. *J Neural Transm* 53: 265-275
- Shiotani Y, Yamano M, Shiosaka S, Emson PC, Hilliard CJ, Girgis S, Mac Intyre J, (1986) Distribution and origins of substance P(SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)- containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* 70:187-192

- Smith CA, Sjöstrand FS (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea-pig cochlea. J Ultrastruct Res 5: 184-192
- Snyder SH, Axelrod J (1965) Circadian rhythm in pineal serotonin: Effect of monoamine oxidase inhibition and reserpine. Science 149: 542-544
- Sjöstrand FS (1958) Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea-pig eye as revealed by three dimensional reconstructions from serial sections. J Ultrastruct Res 2: 122-170
- Stephan FK, Berkley KJ, Moos RL (1981) Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. Neuroscience 6: 2625-2641
- Stetson MH, Watson-Whytmyre M (1976) Nucleus suprachiasmaticus: The biological clock in the hamster? Science 191: 197-199
- Strada S, Klein DC, Weller J, Weiss B (1972) Effect of nor-epinephrine on the concentration of adenosine 3', 5'-monophosphate of rat pineal gland in organ culture. Endocrinology 90: 1470-1475
- Studnicka FK (1905) Die Parietalorgane. In: Oppel A (ed) Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie. V. Springer Jena
- Sudgen D, Klein DC (1983 a) Adrenergic stimulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. Brain Res 265: 348-451
- Sudgen D, Klein DC (1983 b) Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats. J Neurochem 40: 1647-1653
- Sudgen D, Klein DC (1983 c) β -adrenergic receptor control of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase. Endocrinology 113: 348-353
- Theron JJ, Biagio R, Meyer AC, Boekkoi S (1979) Microfilaments, the smooth endoplasmatic reticulum and synaptic ribbon fields in the pinealocytes of the baboon (*Papio ursinus*). Am J Anat 154: 151-162
- Ueck M (1974) Vergleichende Betrachtungen zur neuroendokrinen Aktivität des Pinealorgans. Fortschr Zool 22: 167-203

- Ueck M, (1982) Morphologie und Physiologie des Pinealorgans in der Evolution der Wirbeltiere. Verh Dtsch Zool Ges S. 61-80
- Ueck M, Wake K (1977) The pinealocyte - a paraneuron? Arch Histol Jap 40: 261-278
- Vanecek L, Sudgen D, Weller J, Klein DC (1985) Atypical synergistic α_1 - and β_1 -adrenergic, regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate in cultured rat pinealocytes. Endocrinology 116: 2167-2173
- Vaughan, HK (1984) Pineal peptides: An overview. In: The pineal gland. Reiter RJ (ed) Plenum Press, New York pp 39-81
- Volkman P, Heller A (1971) Pineal N-acetyltransferase activity Effect of sympathetic preganglionic stimulation. Science NY 173: 839-840
- Vollrath L (1973) Synaptic ribbons of a mammalian pineal gland. Circadian changes. Z Zellforsch 145: 171-183
- Vollrath L (1979) Comparative morphology of the vertebrate pineal complex. In: The pineal gland of vertebrates including man. Prog Brain Res 52: 25-38
- Vollrath L (1981) The pineal organ. In: Oksche A, Vollrath L (eds) Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Vol VI/7. Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- Vollrath L (1986) Invers behaviour of synaptic ribbon and spherule numbers in the pineal gland of male guinea-pigs exposed to continuous illumination. Anat Embryol 173: 349-354
- Vollrath L, Huss H (1973) The synaptic ribbons of the guinea-pig pineal gland under normal and experimental conditions. Z Zellforsch 139: 417-429
- Vollrath L, Schulz RL, Mc Millian PJ (1983) Synaptic ribbons and spherules of the guinea-pig pineal gland: Inverse day/night differences in number. Am J Anat 168: 67-74
- Vollrath L, Welker A (1984) No correlation of pineal synaptic ribbon numbers and melatonin formation in individual rat pineal glands. J Pineal Res 1: 187-195

- Wallace RB, Altman J, Das GD (1969) An autoradiographic and morphological investigation of the postnatal development of the pineal body. *Amer J Anat* 126: 175-183
- Wersäll J, Flock A, Lundquist PG (1965) Structural basis for directional sensitivity in cochlear and vestibular sensory receptors. *Cold Spr Harb Symp Quant Biol* 30: 115-132
- Wetterberg L (1983) Melatonin as a chronobiological marker in health and disease. In: *The pineal gland and its endocrine role*. Edited by J. Axelrod, F. Freschini and G.P. Volo (Plenum Publishing Corporation)
- Wilkinson M, Arendt J, Bradke J, De Ziegler D (1977) Determination of a dark-induced increase of pineal N-acetyltransferase activity and simultaneous radioimmunoassay of melatonin in pineal, serum and pituitary tissue in the male rat. *J Endocrinol* 72: 243-244
- Withyachumnarnkul B, Knigge KM (1980) Melatonin concentration in cerebrospinal fluid, peripheral plasma and plasma of the confluens sinuum of the rat. *Neuroendocrinology* 30: 382-388
- Wurtman RJ, Axelrod J, Kelly DE (1968) *The pineal*. Academic Press, New York
- Wurtman RJ, Axelrod J, Fisher EJ (1964) Melatonin synthesis in the pineal gland: Effect of light mediated by the sympathetic nervous system. *Science* 143: 1328-1329
- Zigmond RE, Baldwin C, Bowers CW (1981) Rapid recovery of function after partial denervation of the rat pineal gland suggests a novel mechanism for neural plasticity. *Proc Nat Acad Sci USA* 78: 3959-3963
- Zrenner C (1985) Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: A history. In: *Pineal research reviews Vol. 3* (ed) Reiter RJ, Alan R, Liss., New York pp 2-36

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Vollrath für die Stellung des Themas und die Beratung und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. S. Reuss für die Betreuung der Dissertation und seine wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente.

Herrn Dr. H. Schröder und Herrn J. Stehle danke ich für ihre konstruktive Kritik und ihre stets freundliche und hilfreiche Diskussionsbereitschaft.

Für die Unterstützung bei der Ausführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen gilt mein Dank Frau Schulze und Frau von Graevenitz.

Weiterhin danke ich Frau Henschel für technische Hilfe und Herrn W. Concemius für die Ausführung graphischer Arbeiten.

Lebenslauf

Name: Hans Werner Concemius

Geburtsdatum: 15.09.1955

Geburtsort: Neunkirchen/Saar

Eltern: Werner Concemius, Graphik-Designer
Lydia Concemius geb. Maier

Familienstand: nicht verheiratet

Schulen: 1962 - 1966
Volksschule Wiebelskirchen

1966 - 1975
Gymnasium am Krebsberg, Neunkirchen

Bundeswehr: 1975 - 1976

Universität: 1977 - 1982
Studium der Betriebswirtschafts-
lehre an der Universität des
Saarlandes

1982 - 1987
Studium der Zahnmedizin an der
Johannes Gutenberg-Universität in
Mainz

Approbation am 25. August 1987

